

Hevosen verihiutalerikastettu plasma (PRP): erilaisten valmistusmenetelmien kuvaus ja yhden menetelmän verisolukoostumuksen ja siihen vaikuttavien tekijöiden selvittäminen

Lisensiaatin tutkielma

Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto, Kliinisen hevos-
ja pieneläinlääketieteen osasto

Lotta Alanne

2017

Johtaja: Dos. Antti Iivanainen

Ohjaajat: Dos. Mikael Niku

ELL Erkki Luikko

Dos. Anna-Maija Virtala

Dos. Satu Sankari



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen		Osasto - Avdelning – Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto, Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare – Author Lotta Ida Maria Alanne, ELK			
Työn nimi - Arbetets titel – Title Hevosen verihiutalerikastettu plasma (PRP): erilaisten valmistusmenetelmien kuvaus ja yhden menetelmän verisolukoostumuksen ja siihen vaikuttavien tekijöiden selvittäminen			
Oppiaine - Läroämne – Subject Anatomia ja kehitysbiologia, Eläinlääketieteellinen kliininen diagnostiikka, Mikrobiologia ja epidemiologia			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum - Month and year 03/2017	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 30	
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Verihiutalerikastetun plasman eli PRP:n (platelet rich plasma) käytöstä on tehty lukuisia tutkimuksia hevosten liikuntaeläimistön vammojen hoidossa. Tiedossa ei kuitenkaan ole tarkkaa verihiutalepitoisuutta, jolla saataisiin selkeä kliininen vaste kudosten paranemiselle. Tämän takia tutkimustulokset PRP-hoidosta ovat hyvin vaihtelevia. Tutkimukset ovat toisiinsa nähden usein myös vertailukelvottomia, koska PRP:n eri verihiutalepitoisuuksien lisäksi valkosolupitoisuudet vaihtelevat. Hevoslääketieteen kliinisissä tutkimuksissa on usein myös riittämätön otanta ja niistä saattaa puuttua kontrolliryhmä ja sokkouttaminen. Tästä huolimatta PRP-hoitoa käytetään Suomessa useammalla klinikalla ja hoidettavien hevosten määrä on satoja vuodessa. Hevospraktikoilla on mahdollisuus käyttää lukuisia erilaisia PRP:n valmistusmenetelmiä, jotka tuottavat toisiinsa verrattuna vaihtelevasti rikastuneita verisolupitoisuuksia. Markkinoilla on useita erilaisia kaupallisia vaihtoehtoja, mutta pelkällä praktiikan perusvälineistöllä pystytään taloudellisesti valmistamaan käsin verihiutalerikastettua plasmaa.</p> <p>Tämän lisensiaatin tutkielman tavoitteena oli kuvata erilaisia PRP:n valmistusmenetelmiä hevosilla sekä tutkia yhdellä käsin suoritettavalla valmistusmenetelmällä tuotetun PRP:n verisolusisältöä. Verisolusisältöä verrattiin yksilökohtaisesti hevosen omaan kokovereen ja samalla tutkittiin, vaikuttivatko potilaan hevosyyppi, ikä tai sukupuoli siihen. Hypoteesina hevostyyppin oletettiin vaikuttavan PRP:n verisolupitoisuuksiin, koska lämminveristen ja kylmäveristen kokoveren punasoluarvot poikkeavat toisistaan. Veren solumassasta suurin osa koostuu punasoluista, joiden määrän oletettiin vaikuttavan erotussentrifugoinnin onnistumiseen ja sitä kautta PRP:n verisolupitoisuuksiin.</p> <p>Hevosklinikka Elwet Oy:n PRP-hoitoa saavista potilaista (n = 68) otettiin näyte kokoverestä ja valmistetusta PRP:stä. PRP valmistettiin kahden sentrifugoinnin menetelmällä: erotussentrifugoinnin (500 G, 6,5 min) jälkeen pipetoitiin puolet plasmafraktiosta valkosolukerroksen päältä erotusputkeen, jolle suoritettiin rikastussentrifugointi (800 G, 5 min). Yläosan kirkas plasma poistettiin, ja pohjan sakka homogenisoitiin jäljelle jääneeseen plasmaan.</p> <p>Tämän valmistusmenetelmän PRP:ssä oli keskimääräisesti 1,5-kertaisesti verihiutaleita ja 0,24-kertaisesti valkosoluja alkuperäiseen kokovereen verrattuna. Tutkimuksessa havaittiin kokoveren punasolupitoisuuden vaikuttavan erittäin merkittävästi useiden eri verisolujen rikastumiseen ($p < 0,001$). Mitä enemmän kokoveressä oli punasoluja, sitä enemmän eri verisoluja rikastui. Lämmin- ja kylmäveristen välillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa PRP:n verisolupitoisuuksissa, eivätkä niiden kokoveren punasolupitoisuudet eronneet tilastollisesti merkittävästi. Hypoteesin vastaisesti pelkkä hevosyyppi ei vaikuttanut PRP:n verisolupitoisuuksiin, koska niiden kokoveren punasolupitoisuudet vaihtelivat yksilökohtaisesti. Jokaiselta PRP-hoitoa saavalta potilaalta tulisikin määrittää vähintään kokoveren hematokriitti. Sen perusteella voidaan valita tarvittavat sentrifugointivoimat ja -ajat, kun halutaan valmistaa 1,5-kertaisesti verihiutalerikastunutta PRP:tä, jossa on vain vähän valkosoluja. Nämä verisolupitoisuudet toteutuivat tutkimuksessa käytetyllä valmistusmenetelmällä, kun potilaan hematokriitti oli keskimääräisesti 34 %.</p>			
Avainsanat - Nyckelord – Keywords verihiutalerikastettu plasma, platelet rich plasma, PRP, hevonen			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s) Johtaja: Dos. Antti Iivanainen. Ohjaajat: Dos. Mikael Niku, ELL Erkki Luikko, Dos. Anna-Maija Virtala, Dos. Satu Sankari			

SISÄLLYS

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Verihiutalerikastettu plasma.....	2
2.2	Verihiutaleet	4
2.3	Valkosolut	6
2.4	Punasolut	8
2.5	Antikoagulantti ja aktivaatio	8
2.6	Kaupalliset valmistusmenetelmät.....	10
2.7	Käsin suoritettavat valmistusmenetelmät.....	13
3	Aineisto ja menetelmät	16
3.1	Potilaiden valinta, niistä kerättävät tiedot ja tarvittava potilasmäärä.....	16
3.2	Valmistusmenetelmän kuvaus.....	17
3.3	Näytteiden tutkiminen	17
3.4	Tulosten tilastollinen analysointi	17
4	Tulokset	18
5	Pohdinta	25
6	Kiitokset.....	30
7	Lähdeluettelo	31

1 JOHDANTO

Verihiutalerikastettu plasma eli PRP (platelet rich plasma) on potilaan omasta verestä valmistettu verituote, jossa on rikastettu verihiutaleita potilaan omaan plasmaan. Sitä voidaan kutsua myös verihiutalekonsentraatiksi (PC, platelet concentrate) tai kasvutekijärikkaaksi plasmaksi (PRGF, plasma rich in growth factor) (Wang ym. 2007). Menetelmä on saanut alkunsa 1970-luvulla, jolloin sitä käytettiin erityisesti hammaslääketieteessä suun sisäisten haavojen paranemisen nopeuttamiseen esimerkiksi hammaspoiston yhteydessä. Verihiutaleet sisältävät useita eri kasvutekijöitä, jotka esimerkiksi lisäävät solujen jakautumista, verisuonien muodostumista ja kollageenin tuotantoa, minkä kautta ne edistävät kudonsvaurioiden parantumista (Blair ym. 2009). Verihiutaleiden rikastaminen suoritetaan sentrifugoimalla yleensä antikoaguloitua eli hyytymätöntä kokoverta ja erottamalla siitä haluttu verihiutalerikas osa eli PRP. Antikoagulantin vaikutus voidaan poistaa verihiutaleiden yhteenliittymistä aktivoivalla aineella eli aktivaattorilla, kuten kalsiumyhdisteellä, minkä jälkeen PRP voidaan piikittää vaurioalueelle. Menetelmän toimivuudesta on kiistelty hevosten liikuntaelimistön, kuten jänteiden tai nivelten vammojen hoidossa. PRP-hoidoista on tehty lukuisia tutkimuksia ristiriitaisin tuloksin – monet niistä eivät ole toisiinsa nähden vertailukelpoisia, koska läheskään aina PRP:n valmistusmenetelmää ei ole tarkoin kuvattu tai edes kerrottu sen verisolupitoisuuksia. Tämä johtuu siitä, että menetelmän standardisointi puuttuu edelleen. Tutkimuksien vertailun helpottamiseksi DeLong ym. (2012) ovat kehittäneet PAW-menetelmän, jolla PRP pisteytetään ottamalla huomioon verihiutaleiden lukumäärä (P), käytetty aktivaattori (A) ja valkosolujen lukumäärä (W). Näitä tietoja ei kuitenkaan kerrota kaikissa tutkimuksissa, jolloin niiden vertailu on mahdotonta.

Vaikka PRP:ssä verihiutaleiden rikastaminen on päätavoite, niiden lisäksi monet muutkin veren komponentit, erityisesti valkosolut, vaikuttavat valmistuvan PRP:n toimintaan. Hevospraktiikassa on mahdollisuus käyttää lukuisia kaupallisia valmistusmenetelmiä, joista jokainen kuitenkin tuottaa verisolupitoisuuksiltaan hyvin erilaista PRP:tä. Niistä kaikkia ei myöskään ole suunniteltu käytettäväksi eläinpuolella. Kertakäyttöisten valmistusvälineiden hinnat voivat nousta useisiin satoihin euroihin. Edullisempi tapa valmistaa PRP:tä onkin vaiheittain käsin suoritettava menetelmä praktiikan perusvälineistöllä. Tässä menetelmässä suurin hankintakustannus on tavallinen pöytäsentrifugi. Kirjallisuudessa on lukuisia vaihtoehtoja tekniikoista sekä sentrifugointinopeuksista ja -ajoista, mitkä vaikuttavat PRP:n verisolupitoisuuksiin.

Tässä eläinlääketieteen lisensoitunutta tutkielmassa kuvataan erilaisia PRP:n valmistusmenetelmiä ja tutkitaan yhdellä käsin suoritettavalla valmistusmenetelmällä syntyvän PRP:n verisolusisältöä. Samalla kerätään tietoa yksilön ominaisuuksien aiheuttamista vaihteluista kokoveren solupitoisuuksissa ja siten valmistuvassa PRP:ssä. Hypoteesina hevostyyppin oletettiin vaikuttavan PRP:n verisolupitoisuuksiin, koska lämminveristen ja kylmäveristen kokoveren punasoluarvot poikkeavat toisistaan. Veren solumassasta suurin osa koostuu punasoluista, joiden oletettiin vaikuttavan erotussentrifugoinnin onnistumiseen ja sitä kautta PRP:n verisolupitoisuuksiin.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

Seuraavassa kirjallisuuskatsauksessa avataan käsitettä verihiutalerikastettu plasma, kuvataan sen koostumusta ja kerrotaan erilaisista valmistusmenetelmistä.

2.1 Verihiutalerikastettu plasma

Verihiutalerikastetulla plasmahoidolla pyritään edistämään erilaisten vamma-alueiden parantumista ja vähentämään muodostuvaa arpikudosta, joka etenkin jänne- ja ligamenttivammoissa estää niiden toiminnallisuuden palautumista. PRP on lääkkeetön hoito, jossa hyödynnetään potilaan oman verenkierron luonnollisella tavalla toimivia verihiutaleita, jotka normaalitilanteessakin kulkeutuvat ensimmäisinä kudოსvaurioalueelle. Täällä ne liittyvät yhteen muodostaen veritulpan, jossa niiden vapauttamat kasvutekijät ja kemotaktiset yhdisteet esimerkiksi valkosolujen houkuttelussa ovat tärkeitä tekijöitä kudosten paranemisen säätelyssä (kirjassa Fossum ym. 2013). Potilaan omasta verestä valmistettua verihiutalerikastettua plasmaa voidaan sen autologisuuden eli yksilökohtaisuuden takia pitää erittäin turvallisena, kun verituotteen luovuttajana ei ole toiminut toinen potilas. Näin vältetään verituotteen aiheuttamat immunologiset reaktiot tai verivälitteisten sairauksien leviäminen. Lääkeaineisiin verrattuna PRP-hoito ei myöskään aiheuta allergisia reaktioita. PRP:ssä kudosten uudistusta tukevat ja estävät tekijät ovat luonnollisessa tasapainossa fysiologisina annoksina, jolloin sitä on turvallista käyttää verrattuna yksittäin annosteltaviin kasvutekijöihin (Yuan ym. 2013). Koirilla tehdyssä tutkimuksessa pelkän fibroblasteja stimuloivan FGF-kasvutekijän (fibroblast growth factor) lisääminen koukistajajänteen vaurioon aiheutti arpikudoksen muodostumista jännealueen viereen, mikä lopulta rajoitti raajan liikelaajuuden palautumista normaaliksi (Thomopoulos ym.

2010). Yksittäisten kasvutekijöiden käyttäminen olisi myös PRP-hoitoon verrattuna huomattavasti kalliimpaa.

Hevosilla PRP-hoitoa on käytetty esimerkiksi jännevammojen ja erilaisten pinnallisten ja syvien ihohaavojen hoidossa. Tutkimustulokset ovat vaihtelevia; Brossin ym. (2015) 123 humaani- ja hevoslääketieteen tutkimusta käsittävässä kirjallisuuskatsauksessa PRP-hoidolla saavutettuja hyödyllisiä tuloksia oli 47 %:ssa kliinisistä ja 73 %:ssa kokeellisista tutkimuksista. Erityisesti hevoslääketieteen kliinisissä tutkimuksissa heikot tutkimusasetelmat lisäsivät harhojen riskiä. Otannat olivat usein hyvin pieniä, kontrolliryhmää ei välttämättä käytetty tai eri tavalla hoidettuja ei sokkoutettu. Lisäksi PRP:n valmistus- ja annostelumenetelmät poikkesivat toisistaan eri tutkimuksissa. Kliinisistä tutkimuksista 58 %:ssa ei kerrottu PRP:n verisolusisältöä. Käytännössä tällaisten tutkimusten johtopäätöksistä ei voidakaan ottaa millään tasolla kantaa PRP-hoidon hyödyllisyyteen.

Varsinaista tarkkaa PRP:n verihiutalelukua, jolla olisi kliininen vaste, ei olekaan pystytty määrittämään. PRP:n verihiutaleiden rikastumista kokovereen verrattuna voidaan kuvailla matalaksi (<1), kun PRP:ssä ei ole kokovereen verrattavaa määrää verihiutaleita. Kun PRP:n verihiutalelukumäärä ylittää kokoveren pitoisuuden, rikastumista voidaan kuvata keskinkertaiseksi (1–4), korkeaksi (4–6) tai erittäin korkeaksi (>6) (DeLong ym. 2012). Rikastumisen lukuarvo lasketaan kaavalla $(\text{PRP:n solupitoisuus})/(\text{kokoveren solupitoisuus})$. Ihmisillä PRP:n verihiutalepitoisuuden oletetaan yleisesti olevan 3–5-kertainen kokovereen verrattuna. Ihmisten verihiutalepitoisuus ($200 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) on korkeampi kuin hevosten ($140 \cdot 10^3/\mu\text{l}$), joten ihmisten PRP:n verihiutalepitoisuussuosituksia ei käytännössä voida suoraan siirtää hevoselle (Fontenot ym. 2012). Valmistusmenetelmässä on kuitenkin huomioitava, että yksilön kokoveren verihiutalepitoisuus on suoraan verrannollinen valmistuvan PRP:n verihiutalepitoisuuteen (Boswell ym. 2012). Kun yhden potilaan kokoveren verihiutalepitoisuus on $100 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ja toisen $150 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, 2-kertaisesti rikastavalla valmistusmenetelmällä ensimmäisen potilaan PRP:n verihiutalepitoisuus on $200 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ja toisen $300 \cdot 10^3/\mu\text{l}$. Tällöin yhdellä valmistusmenetelmällä on mahdotonta saavuttaa jokaisella hoidettavalla yksilöllä yhtä korkeaa PRP:n verihiutalepitoisuutta.

Tutkimustuloksia PRP-hoidon kliinisestä vasteesta on haastava vertailla, koska käytetyn PRP:n koostumus vaihtelee valmistusmenetelmästä riippuen suuresti. Seuraavissa tutkimuksissa on hoidettu hevosten jäniteitä piikittämällä kaupallisesti valmistettua

PRP:tä suoraan jänteen vamma-alueeseen, joka on todettu ultraäänien avulla. Bosch ym. (2010) käyttivät hevosilla (n = 6) plasebokontrolloidussa tutkimuksessaan GPS II:lla (Zimmer Biomet, Warsaw, Indiana, USA) valmistettua PRP:tä, jonka verihiutalepitoisuus oli 3,8-kertainen ja valkosolupitoisuus 6,0-kertainen kokovereen verrattuna. Hevosille oli mekaanisesti aiheutettu samanlainen vamma molempien etujalkojen pinnalliseen koukistajajänteeseen. Saman hevosien yhteen etujalkaan pistettiin PRP:tä ja toiseen suolaliuosta, joka toimi kontrollina. PRP-hoidetuissa koukistajavammoissa oli 24 viikon kuluttua enemmän kollageenia ja glukosaminoglykaania, jänteen rakenne oli järjestäytynyt lähemmäs alkuperäistä ja sen mekaaninen kestävyys oli parempi verrattuna kontrolliryhmään ($p < 0,05$). Geburek ym. (2016) käyttivät kliinisessä satunnaistetussa tutkimuksessaan hevosten pinnallisiin koukistajajännevammoihin Osteokine®:llä (Orthogen, Düsseldorf, Saksa) valmistettua korkeapitoista PRP:tä, jonka verihiutaleiden ja valkosolujen rikastumiset olivat 5,7 ja 1,8 -kertaiset kokovereen verrattuna. PRP-hoidettujen potilaiden (n = 10) ontuma lieveni tilastollisesti merkitsevästi kahdeksan viikon kuluttua hoidosta, kun suolaliuosta saaneella kontrolliryhmällä (n = 10) ontuman lieventyminen tapahtui viikolla 12. PRP-hoidetuista potilaista 80 % oli vuoden kuluttua omalla tai aiempaa paremmalla suoritustasollaan verrattuna kontrolliryhmään, josta puolet saavutti samassa ajassa oman suoritustasonsa. Rindermann ym. (2010) käyttivät matalampia PRP-pitoisuuksia ACP Double syringe:llä (Arthrex, München, Saksa): verihiutalepitoisuus oli 1,3-kertainen ja valkosolut vähentyivät 0,1-kertaiseksi kokovereen verrattuna. Erilaisista jännevammoista kärsivät hevoset (n = 7) parantuivat 7–9 kuukauden kuluttua PRP-hoidosta takaisin normaaliin käyttöönsä. Tutkimuksessa ei ollut kontrolliryhmää.

2.2 Verihiutaleet

Verihiutaleet ovat tumattomia, verenkierrossa liikkuvia kiekon muotoisia kappaleita, jotka ovat revenneet megakaryosyyteistä luuytimessä (kirjassa Sjaastad ym. 2010). Niiden tunnetuin toiminta liittyy veren hyytymiseen. Elimistön sisältä tai ulkopuolelta tuleva molekyyli, kuten kalsium tai trombiini, käynnistää verihiutaleen aktivoitumisen. Aktivoituessaan verihiutaleen rakenne muuttuu ja se alkaa erittää itsestään ulos useita eri molekyyliä, mikä johtaa lopulta veritulpan muodostumiseen. Näistä molekyyleistä PRP:n klinisen toiminnan kannalta tärkeimmät löytyvät α -granuloidien kasvutekijöistä. α -granuloita on jokaisessa verihiutaleessa noin 50 – 80 kappaletta, jolloin ne täyttävät noin 10 % verihiutaleen tilavuudesta (Blair ym. 2009). Kasvutekijöistä

verihiutaleperäinen PDGF (platelet-derived growth factor) säätelee muiden solujen liikkumista, verisuonten uudismuodostusta, fibroblastien eli epäkypsien sidekudossolujen jakautumista, makrofagien aktivaatiota ja tehostaa muiden kasvutekijöiden eritystä. Transformoiva TGF- β (transforming growth factor- β) tehostaa solujen jakautumista ja kollageenin tuottoa. Verisuonten endoteelin VEGF (vascular endothelial growth factor) tehostaa verisuonten uudismuodostusta. Insuliininkaltainen IGF-1 (insulin-like growth factor) tehostaa fibroblastien jakautumista ja soluvaellusta, kollageeni- ja proteiinisynteesiä ja epidermaalinen EGF (epidermal growth factor) tehostaa kollageenisynteesiä (Yuan ym. 2013, Boswell ym. 2012). Kasvutekijöiden lisäksi α -granuloissa on verihiutaleiden yhteen liittymiseen tarvittavia proteiineja, kuten fibrinogeenia ja von Willebrandin –tekijää, hyytymistekijöitä (V, XI, XIII ja protrombiini) sekä veritulppaa hajottavia tekijöitä, kuten antitrombiinia, plasmiinia ja plasminogeenia (Blair ym. 2009). Kudosta parantavien proteiinien, kuten ruston soluväliaineen eli COMP:in (cartilage oligomeric matrix protein) (Boswell ym. 2014) lisäksi verihiutaleet sisältävät myös antimikrobiaalisia proteiineja (PMP, platelet microbicidal protein) sekä tulehdusta säätelevä interleukiineja ja kemokiineja (Salamanna ym. 2015, Mariani ym. 2015).

Vamma-alueelle päästyään verihiutaleet koaguloituvat muodostamalla fibriinigeelistä kolmiulotteisen bioaktiivisen mikrorakennelman (Salamanna ym. 2015; Yuan ym. 2013). Noin kymmenen minuutin kuluttua 70 % kasvutekijöistä on vapautunut α -granuloista (Salamanna ym. 2015) ja sulautunut verihiutaleen solukalvolle, jossa ne muuttuvat aktiivisiksi. Kasvutekijät sitoutuvat erittymisensä jälkeen kohdesolun, kuten osteoblastin tai fibroblastin, solukalvon reseptoriin, joka aktivoi solunsisäisen signaaliproteiinin, joka on käynnistämässä esimerkiksi solunjakautumiseen vaikuttavia geenejä (Dhurat ym. 2014). Verihiutaleiden muodostaman kolmiulotteisen rakennelman ansiosta kasvutekijät vapautuvat säädellysti. Jos kasvutekijät olisivat vapaana plasmassa, niiden puoliintumisaika olisi selvästi nopeampi (Davis ym. 2014), jolloin vaikutukset olisivat myös lyhemmät. Tällaista kolmiulotteista, geelimäistä PRP:tä kutsutaan plasman sijaan verihiutalerikkaaksi fibriiniksi, PRF:ksi (platelet rich fibrin), jota voidaan käsiteltävyytensä ansiosta käyttää esimerkiksi haavojen sulkemiseen (Anitua ym. 2015). Toisaalta liian korkeiden fibriinipitoisuuksien uskotaan vähentävän epäkypsien sidekudossolujen jakautumista ja biosyntetistä aktiivisuutta (Yuan ym. 2013).

PRP:n valmistuksessa verihiutaleita on siis tarkoitus rikastaa, mutta Kisiday ym. (2012) osoittivat hevosen polven nivelkierukan biosynteesin laskevan käytettäessä viisinkertaisesti rikastettuja verihiutaleita, verrattuna kolminkertaisesti rikastettuun *in vitro*. Yoshida ym. (2014) taas osoittivat *in vitro*, että kokoverta vastaava verihiutalepitoisuus edisti paremmin sian polven ristisiteen fibroblastien aineenvaihduntaa ja prokollageenin ilmentymistä sekä esti solukuolemaa verrattuna kolme- ja viisikertaisiin verihiutalepitoisuuksiin. Tulokset eri tutkimuksissa ovat kuitenkin hyvin vaihtelevia. Boswell ym. (2014) totesivatkin omassa *in vitro* -tutkimuksessaan, että verihiutalepitoisuuden maksimointi hevosen pinnallisen koukistajajänteen vamman paranemisen tehostamiseksi ei ole yhtä tärkeää, kuin valkosolupitoisuuden minimointi.

2.3 Valkosolut

Valkosolupitoista PRP:tä voidaan kutsua L-PRP:ksi (leukocyte and platelet rich plasma), kun taas P-PRP (pure platelet rich plasma) sisältää lähinnä verihiutaleita. Valkosolut ovat verihiutaleen tapaan lähtöisin luuytimeistä, ja ne jaotellaan soluliman jyvästen perusteella granulaarisiin ja non-granulaarisiin valkosoluihin. Granulaarisia eli jyväsellisiä valkosoluja ovat neutrofiilit, basofiilit ja eosinofiilit, non-granulaarisia eli jyväsettämiä ovat lymfosyytit ja monosyytit, sekä niihin kuuluvat makrofagit (kirjassa Sjaastad ym. 2010). Valkosolut erittävät sytokiineja eli tulehdusvälittäjäaineita, jotka ovat usein katabolisia tai tulehdusta edistäviä (Sundman ym. 2011), kuten interleukiini-1 β (IL-1 β), tuumorinekroosifaktori- α (TNF- α) sekä entsyymejä, kuten ruston soluväliaineen metalloproteinaaseja (MMP) (Yuan ym. 2013). Metalloproteinaaseihin kuuluvat proteolyttiset gelatinaasi- ja kollagenaasientsyymit, jotka ovat tärkeitä luustolihas kudosten uudelleen rakentumisessa ja homeostasian ylläpidossa. Korkeissa pitoisuuksissa niiden aiheuttama katabolia kuitenkin ylittää anabolian, jolloin regeneraatiota ei enää tapahdu (Pifer ym. 2014). Erityisesti neutrofiilit yhdistetään MMP:ien ja happiradikaalien vapautumiseen, mitkä voivat vahingoittaa kudosta (Yuan ym. 2013). Tämän takia niiden pitoisuutta tulisi pyrkiä vähentämään PRP:ssä. Haavan paranemisvaiheessa neutrofiilien happiradikaalit hajottavat nekroottista materiaalia ja bakteereita, jolloin niiden rooli on lähinnä haavan puhdistamisessa, eikä haavan paranemisessa (kirjassa Fossum ym. 2013). PRP:n neutrofiilisisällön uskotaankin olevan tärkein ristiriitaisten kliinisten tutkimustulosten syy (DeLong ym. 2012). Lisäksi Anitua ym. (2015) osoittivat ihmisverestä valmistetun L-PRP:n fibriniirakennelman olevan

heikompi sen sisältäessä valkosoluja ja punasoluja. L-PRP:n fibrinirakennelma ei myöskään kestänyt P-PRP:een verrattuna gram-negatiivisten bakteerien lipopolysakkaridien aiheuttamia tulehduksellisia olosuhteita.

Jyväsettömien valkosolujen esiintyminen L-PRP:ssä on yhdistetty runsaampaan kasvutekijöiden vapautumiseen, tyyppin I ja III prokollageenien (*COL1A1* ja *COL3A1*) voimakkaampaan ilmentymiseen ja kollageenin tuottoon (Yuan ym. 2013). Verihiutaleiden uskotaan aktivoivan VEGF-kasvutekijän kautta jyväsettömiä valkosoluja, kuten makrofageja, erittämään interleukiinia (IL-6), joka tehostaa jänteiden fibroblastien kollageenin tuotantoa kiihdyttäen paranemisprosessia (Mariani ym. 2015, Yoshida ym. 2013). Toisaalta *COL3A1* on yhdistetty arven muodostumiseen, mikä pehmytkudosten, kuten jänteiden kohdalla ei ole toivottavaa niiden normaalin toiminnan kannalta (Boswell ym. 2014; kirjassa Ross ym. 2011). Cavallo ym. (2014) taas osoittivat *in vitro* -tutkimuksessaan ihmisten rustosolujen tuottavan enemmän hyaluronaattia käytettäessä valkosolurikasta L-PRP:tä. Korkeammat VEGF-, TGF- ja PDGF-kasvutekijäpitoisuudet selittyvätkin sillä, että valkosolut itsessään sisältävät myös näitä kasvutekijöitä ja L-PRP:ssä verihiutalepitoisuuskin valkosolujen lisäksi on yleensä P-PRP:tä korkeampi. Etenkin monosyyttejä pidetään tärkeinä haavan paranemisessa; ne erittävät runsaasti kasvutekijöitä, kuten TGF- β ja VEGF, jotka ehkäisevät tulehdusta, lisäävät verisuonten kasvua ja tukevat kollageenituotantoa (kirjassa Fossum ym. 2013, Boswell ym. 2012). Monosyyteistä erikoistuvat makrofagit stimuloivat verisuonten kasvua ja säätelevät ruston soluväliaineen tuotantoa. Niiden puute aiheuttaisikin selvää heikentymistä vamman paranemisessa. Lymfosyytit taas erittävät tekijöitä, jotka yleensä parantavat kudoksen korjaantumisen laatua, mutta niiden tai neutrofiilien puuttuminen ei häiritse kudosten paranemista (kirjassa Fossum ym. 2013).

Toisaalta valkosolut ovat hyödyksi nekroottisen kudoksen hajottamisessa. Etenkin luunmurtumissa ensimmäisenä vaurioalueelle kulkeutuvat neutrofiilit ovat tarpeellisia niiden hajottaessa nekroottista kudosta. Seuraavaksi paikalle saapuvat makrofagit fagosytoivat kuolleet neutrofiilit ja jatkavat kudosaaurioalueen puhdistamista edesauttaen paranemista. (Davis ym. 2014). Valkosolujen immunitettia muokkaavat ominaisuudet ovatkin luonnollisina annoksina tärkeitä kudosten paranemisessa, mutta L-PRP:n korkeissa pitoisuuksissa niiden uskotaan olevan haitallisia (DeLong ym. 2012).

Lisäksi valkosolujen antimikrobiaalisista ominaisuuksista PRP:ssä on kiistelty. Niiden on ajateltu ehkäisevän epästeriilin pistoksen aiheuttamaa infektiota, mutta Mariani ym.

(2015) osoittivat *in vitro* -tutkimuksessaan, ettei ihmisten verestä valmistetuilla L- ja P-PRP:llä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa erilaisten mikrobien kasvun estämisessä. Molemmat vähensivät neljän tunnin ajan *Escherichia coli* ja *Pseudomonas aeruginosa* -pesäkkeiden kasvua, mutta kumpikaan ei vaikuttanut *Klebsiella pneumoniae* -pesäkkeiden kasvuun. Tästä voidaan päätellä, etteivät valkosolut vastaa PRP:n antimikrobiaalisista ominaisuuksista, vaan verihiutaleiden omat mikrobeja tuhoavat proteiinit, PMP:t, ovat tärkeämmässä asemassa. Näihin kuuluvan verihiutaleiden perusproteiinin, PBP:n (platelet basic protein) johdannainen NAP-2 (neutrophil-activating peptide) on neutrofiilejä aktivoiva peptidi, joka toimii mikrobeja tuhoavana protelyytinä. Lisäksi se houkuttelee neutrofiilejä, mikä tehostaa edelleen mikrobien tuhoamista.

2.4 Punasolut

Hevosten punasolut ovat pienehköjä suhteessa muihin nisäkkäisiin ja niillä perna toimii erityisenä punasolujen varastona. Adrenaliinin vaikutuksesta liikunnan tai stressin yhteydessä suuria määriä punasoluja vapautetaan pernasta verenkiertoon (kirjassa Thrall ym. 2004). Saman yksilön punasolupitoisuus voikin vaihdella mittauksesta toiseen näytteenottotilanteesta aiheutuvan stressin mukaan.

Punasolut pyritään poistamaan PRP:n valmistuksessa sentrifugoinnin avulla, koska ne eivät sisällä toivottuja kasvutekijöitä, ja ovat ikään kuin tyhjää massaa. Harrison ym. (2011) totesivat, että fysiologisena tai sen ylittävänä pitoisuutena punasolut estävät janteen fibroblastisolujen jakautumista ja hidastavat kollageenigeelin supistumista. Tämä johtuu punasolujen sisältämän hemoglobiinin hajoamistuotteen, bilirubiinin, myrkyllisyydestä, mikä johtaa fibroblastisolujen mitokondriaalisen aktiivisuuden hidastumiseen ja lopulta niiden hajoamiseen. Lisäksi punasolun hajotessa hemoglobiinista vapautuva rauta katalysoi vapaita happiradikaaleja, mikä lisää kohdealueen solujen solukuolemaa (Boswell ym. 2012).

2.5 Antikoagulantti ja aktivaatio

Verihiutaleiden kontakti kalsiumin, kudostrauma-alueelta vapautuvan kollageenin tai vain negatiivisesti varautuneen lasin kanssa aiheuttaa niiden fibriinirakennelman muodostumisen ja yhteen liittymisen. Tätä tapahtumaa kutsutaan verihiutaleiden aktivoitumiseksi, minkä jälkeen ne alkavat vapauttaa kasvutekijöitä α -granuloistaan (Davis ym. 2014). Pelkkä veren keruu veriputkeen aiheuttaa verihiutaleiden

aktivoitumisen ja kasvutekijöiden ennenaikaisen vapautumisen. Antikoagulantin eli hyytymistä estävän tekijän käyttö veren keruussa onkin välttämätöntä, jotta PRP:n valmistaminen olisi mahdollista. Antikoagulanttina käytetään yleensä sitraattijohdannaista, joka sitoutuu plasman kalsiumiin estäen verihiutaleen aktivoitumista (Davis ym. 2014). Antikoagulanteista sitraatti-A-dekstroosihappo säilyttää verihiutaleen fysiologiset ja rakenteelliset ominaisuudet usean tunnin ajan, jolloin sen käyttö on suositeltavaa, jos PRP:n valmistuksen ja käytön välillä kuluu aikaa (Giraldo ym. 2015). EDTA-antikoagulantti (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) voi tuhota verihiutaleita, ja sen käyttöä ei voida suositella lainkaan (Davis ym. 2014).

Veren keruussa käytetyn antikoagulantin vaikutuksen kumoamiseksi voidaan käyttää fysiologisia tai kemiallisia yhdisteitä, jotka johtavat PRP:n verihiutaleiden aktivoitumiseen ja sitä kautta kasvutekijöiden vapautumiseen. Kudosvauriosta itsestään vapautuva kollageeni riittää myös aktivointiin, joten pehmytkudokseen piikitettäessä erillisen aktivaattorin lisääminen ei ole tarpeellista (Dhurat ym. 2014). Fysiologisista aktivaattoreista yleisin on nautaperäinen trombiini, joka on kuitenkin yhdistetty systeemisten allergisten reaktioiden syntyyn (Davis ym. 2014; Brossi ym. 2015). Trombiini muuttaa fibrinogeenin liukoiseksi fibriiniksi, joka polymerisoituessaan etenkin korkeissa trombiinipitoisuuksissa muodostaa jäykän rakennelman, joka haittaa solujen vaeltamista. Kemiallisista yhdisteistä yleisimpänä aktivaattorina käytetään kalsiumsuoloja, kuten 10 %:sta kalsiumkloridia, joka kumoaa antikoagulantin vaikutuksen, ja fibriinirakennelman muodostuminen voi alkaa (Davis ym. 2014). Kalsiumkloridi kuitenkin saattaa happamoida PRP:tä, minkä uskotaan aiheuttavan pistokohdassa kipua ja polttavaa tunnetta (DeLong ym. 2012). Textor ym. (2013) vertasivat terveillä hevosilla (n = 6) trombiinilla (10 U/ml) ja kalsiumkloridilla (3,4 mg/ml) aktivoidun PRP:n vaikutuksia nivelensisäisesti suolaliuoskontrolliin verrattuna. Trombiinilla aktivoitu PRP aiheutti tilastollisesti merkitsevästi vahvemmat reaktiot taivutuskokeessa ja lisäsi nivelen nestetäyttyneisyyttä kalsiumkloridiin verrattuna. Trombiinia ei voidakaan suositella nivelensisäisesti käytettävän PRP:n aktivaattorina.

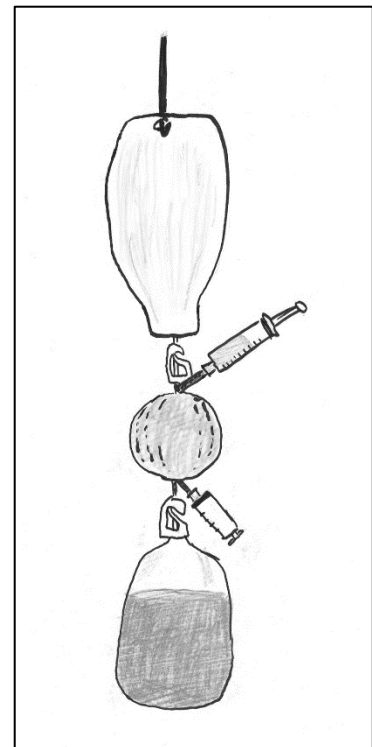
2.6 Kaupalliset valmistusmenetelmät

Tällä hetkellä on tarjolla lukuisia erilaisia kaupallisia PRP:n valmistusmenetelmiä (taulukko 1), jotka perustuvat kokoveren verisolujen erotteluun suljetussa systeemissä. Valmistusmenetelmät eroavat toisistaan veren keräysastian tyypillä ja toiminnalla, mitkä vaikuttavat voimakkaasti valmiin PRP:n tilavuuteen sekä verihiutaleiden, valkosolujen ja punasolujen saantoon (Mazzocca ym, 2012, Sundman ym. 2011). Veren keräysastiassa on yleensä mekanismi, joka erottaa vähintään punasolut plasmasta ja muista verisoluista. Nimenomaan hevospraktiikkaan kehitetyn ProTec®:in (kuva 1, PulseVet, Alpharetta, Georgia, USA) veriputken erottelevan geelin luvataan yhden sentrifugoinnin jälkeen antavan puhdasta P-PRP:tä kohtuullisella verihiutaleen rikastumisella. Hevosille kehitetyn E-PET:in (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) seuraajan V-Pet™:in (kuva 2, VetStem Biopharma, Poway, California, USA) verisolujen erottelu veripussista perustuu painovoimaan ilman sentrifugia. Tämä helpottaa tallikäynnillä suoritettavaa hoitoa, kun sentrifugia ei tarvitse tuoda mukana. Painovoimaan perustuva erottelu kestää noin 15 minuuttia. Menetelmässä hyödynnetään 7-kertaista filteriä, joka erottelee verihiutaleet niiden koon ja polaarisuuden perusteella. Osteokine®:ssä (Orthogen, Düsseldorf, Saksa) käytetään myös veripussia, mutta erottelun nopeuttamiseksi se sentrifugoidaan kahteen kertaan.

GPS III:n (kuva 3, Zimmer Biomet, Warsaw, Indiana, USA) poijumekanismi erottaa sentrifugoinnin jälkeen putken yläosan verisoluköyhän plasman, alaosan



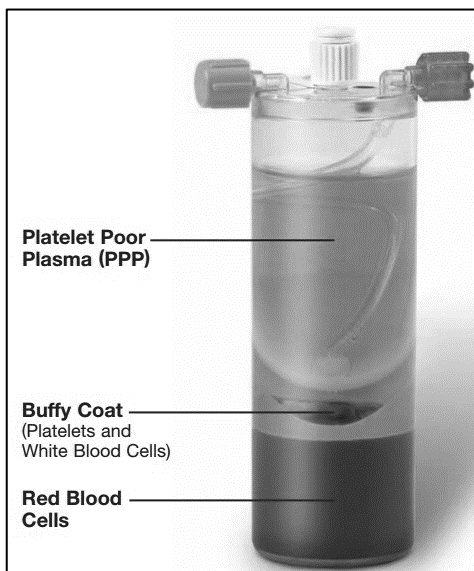
Kuva 1 ProTec (PulseVet, Alpharetta, Georgia, USA) Kuva julkaistu tekijän luvalla.



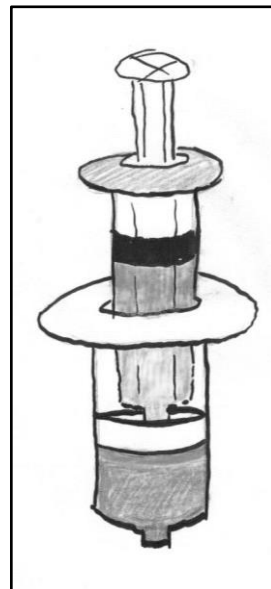
Kuva 2 V-Pet™ (VetStem Biopharma, Poway, California, USA) Kuva mukailtu <http://www.vet-stem.com/pdfs/6605-0017-001%20V-PET%20Introduction.pdf>

punasolupylvään ja keskiosan verihiutale- ja valkosolurikkaan plasman. PRP otetaan keskiosasta, jolloin verihiutaleita sekä valkosoluja saadaan rikastettua mahdollisimman voimakkaasti ja sitä voidaan kutsua L-PRP:ksi. ACP:n (kuva 4, Arthrex, München, Saksa) kahden ruiskun systeemillä kerran sentrifugoidusta kokoverestä saadaan imettyä annosteluruiskuun vain valkosolukerroksen yläpuolella oleva plasma, josta saadaan P-PRP:tä.

Kaupallisten valmistusmenetelmien tärkein ominaisuus käsin suoritettavaan valmistusmenetelmään verrattuna on varmasti niiden hygieenisyyden turvaaminen. Potilaan veri otetaan kertakäyttöiseen keräilyputkeen tai -pussiin, joka toimii suljettuna systeiminä aina verenkeruusta koko käsittelyn läpi, jolloin altistukselta esimerkiksi ilman tai käsittelijän kontaminaatiopartikkeleille voidaan välttyä. Lisäksi näiden toistettavuus on yleensä hyvä eikä tekijän virheillä ole syntyviin verisolupitoisuuksiin niin suurta merkitystä (Fontenot ym. 2012).



Kuva 3 GPS III (Zimmer Biomet 2016) Kuva julkaistu tekijän luvalla.



Kuva 4 ACP (Arthrex, München, Saksa) Kuva mukailtu <https://www.arthrex.com/orthobiologics/platelet-rich-plasma>

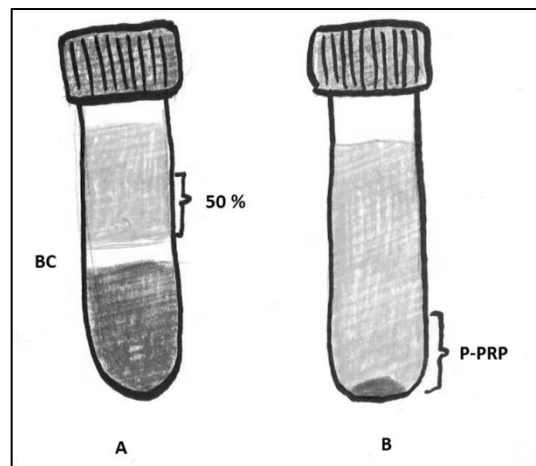
Taulukko 1 PRP:n kaupallisten valmistusmenetelmien verisolujen rikastuminen (laskettu kaavalla (PRP:n solupitoisuus)/(kokoveren solupitoisuus)), listattu kaupanimen mukaan. X = ei ilmoitettu, hkr = hematokriitti, PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma)

Tuotteen nimi ja valmistaja	Kohdelaji	Verihiutaleet	Valkosolut	Punasolut	Lähteet
ACP (Autologous Conditioned Plasma)	Ihminen	2,0	0,1	X	Sundman ym. 2011
Double Syringe System	Hevonen	2,7	0,1	0,05	Mazzocca ym. 2012
		1,3	0,1	X	Rindmann ym. 2010
		1,3	0,09	X	Hessel ym. 2015
Arthrex, München, Saksa					
E-PET (Equine-Platelet Enhancement Therapy™)	Hevonen	7,0	4,0	X	Pall corporation 2016
		3,7	1,8	X	Hessel ym. 2015
		3,2	1,9	X	Textor ym. 2013
Pall Corporation, Port Washington, NY, USA					
Genesis CS-2	Hevonen	5,4	X	X	Vet-Stem biopharma, Genesis CS-2 2016
Vet-Stem Biopharma, Poway, California, USA					
GPS II	Hevonen	3,8	6,0	X	Bosch ym. 2010
Zimmer Biomet, Warsaw, Indiana, USA					
GPS III Platelet Concentration System	Ihminen	7,3	5,2	0,23	Oh ym. 2015
	Ihminen	6,1	3,6	0,24	Mazzocca ym. 2012
	Kani	7,3	8,2	0,17	Dragoo ym. 2012
Zimmer Biomet, Warsaw, Indiana, USA	Hevonen	5,3	6,6	X	Hessel ym. 2015
ProTec® PRP	Hevonen	2 (hkr 50 %)	minimoitu / ei ole	ei ole	Pulse Veterinary Technologies 2013
PulseVet, Alpharetta, Georgia, USA					
Osteokine® PRP	Hevonen	5,7	1,8	X	Geburek ym. 2016
Orthogen, Düsseldorf, Saksa					
SmartPREP2	Ihminen	5-6	3,6	X	Harvest Technologies 2016
Harvest Technologies					
V-Pet™ (Veterinary platelet enhancement therapy)	Hevonen	jopa 7	X	X	Vet-Stem biopharma, V-Pet 2016
	Koira				
Vet-Stem Biopharma, Poway, California, USA					

2.7 Käsin suoritettavat valmistusmenetelmät

Käsin suoritettavissa valmistusmenetelmissä hyödynnetään praktiikan perusvälineistöä, kuten veriputkia, sentrifugia ja pipettejä. Veri kerätään tavanomaisesti, yleensä antikoagulanttia sisältäviin vakuumiveriputkiin, joista sentrifugoinnin jälkeen pipetoidaan käsin haluttu PRP-fraktio. Fraktion pipetoinnissa voidaan käyttää kahta erilaista erottelutapaa, joista toinen perustuu plasmaan ja toinen valkosolukerrokseen. Plasmaan perustuvassa menetelmässä on tarkoitus saada pelkkiä verihiutaleita välttämällä valkosoluja. Pipetoimalla valkosolukerros mukaan saadaan varmasti kaikki verihiutaleet talteen, mutta samalla myös runsaasti valkosoluja ja jonkin verran punasoluja (DeLong ym. 2012). Tämän ensimmäisen erottelun jälkeen sentrifugointi voidaan vielä toistaa. Ensimmäistä sentrifugointikertaa voidaankin ajatella punasolujen erottamisena plasmasta ja muista verisoluista ja toista sentrifugointia verihiutaleiden sekä mahdollisesti myös valkosolujen rikastamisena. Käytännössä siis erotettu fraktio pipetoidaan uuteen putkeen, ja alkuperäisen veriputken pohjalle tiivistyneet punasolut jätetään käyttämättä. Valkosolujen saantoon vaikuttaa paljon se, pipetoidaanko valkosolukerros mukaan. Toisessa sentrifugoinnissa plasmafraktioilla täytettyjen putkien pohjalle tiivistyvät jäljelle jääneet solukomponentit, eli verihiutaleet sekä mahdollisesti myös valkosolut ja hieman punasoluja. Laimea yläpuolen plasma PPP (platelet poor plasma) voidaan pipetoimalla poistaa putkesta, ja pohjalle tiivistynyt solumassa sekoitetaan jäljelle jääneeseen plasmaan. Tällaista kahden sentrifugoinnin menetelmää, jossa vältetään valkosolukerroksen pipetointia, on käytetty esimerkiksi Giraldo ym. (2013, 2015) tutkimuksissa (kuva 5) Taulukossa 2 on listattuna eri tutkimuksissa käytettyjä käsin suoritettavia valmistusmenetelmiä ja niiden sentrifugointivoimia tai -kierroslukuja ja käytettyä aikaa.

Brossin ym. (2015) kirjallisuuskatsauksessa kokeellisista tutkimuksista yhden sentrifugoinnin valmistusmenetelmistä 86 % tuotti positiivisia tuloksia, eli



Kuva 5 A-kohdassa ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen plasmasta pipetoidaan puolet valkosolukerroksen (BC = buffy coat) yläpuolelta erilliseen erotusputkeen. B-kohdassa erotusputki on sentrifugoitu ja siitä poistetaan 2/3 yläosan plasmasta. Pohjan loput verisolut sekoitetaan ja saadaan P-PRP:tä (Giraldo ym. 2013, 2015). P-PRP: puhdas verihiutalerikastettu plasma (pure platelet rich plasma).

tutkimusasetelmasta riippuen johti kudosaaurion paranemisen edistymiseen histologisesti tai *in vivo*. Kahden sentrifugoinnin valmistusmenetelmällä vastaava osuus oli 75 %. Vaikka kahdella sentrifugoinnilla verihiutaleita saadaan rikastettua enemmän, niiden morfologia eli rakenne yleensä kärsii useammasta käsittelykerrasta. Morfologiamuutosten takia verihiutaleet voivat vapauttaa kasvutekijänsä ennenaikaisesti, jolloin ne eivät siis päädy yhtä aktiivisina ja toimintakykyisinä potilaaseen (Oh ym. 2015).

Käsin suoritettavissa valmistusmenetelmissä tekijällä on suuri vaikutus PRP:n laatuun. Jos ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen pipetoidaan liian kaukaa valkosolukerroksesta, pipetoidaan enimmäkseen puhdasta plasmaa, jolloin verihiutaleita ei saada rikastumaan seuraavan sentrifugointiin. Jos taas pipetoitaessa vahingossa ”puhalletaan” valkosolukerros ja osa punasoluista plasman sekaan, tulevat valkosolut ja punasolut rikastumiseen mukaan. Lisäksi ympäristöstä tai tekijästä johtuvat kontaminaatiot ovat mahdollisia, koska veriputkia joudutaan avaamaan ja sisältöä käsittelemään ennen kuin PRP olisi valmis käytettäväksi. Fontenotin ym. (2012) tutkimuksessa neljällä erilaisella valmistusmenetelmällä tehdystä valkosolurikkaasta L-PRP:stä 280:sta näytteestä kuudessa eli 2,1 %:ssa tavattiin bakteerikasvua, mistä suurimman osan oletettiin olevan peräisin ympäristön kontaminanteista, sekä mahdollisesti myös viljelmien elatusaineesta. Valmistusmenetelmistä yksi oli kaupallinen, suljettu menetelmä. Eri valmistusmenetelmien bakteeriviljelmien pesäkkeiden kasvussa ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Tutkimustuloksen perusteella voidaankin ajatella, että käsin valmistetun PRP:n puhtaus on saavutettavissa samalla tasolla verrattuna kaupallisiin, suljettuihin menetelmiin. Laminaarikaapin hyödyntäminen valmistuksessa vähentäisi edelleen kontaminaatioiden määrää, mutta kaikissa praktiikkaolosuhteissa tämä ei ole mahdollista. Álvarez ym. (2009) osoittivat, että käsin suoritettulla kahden sentrifugoinnin valmistusmenetelmällä laminaarikaapin tai liekityksen käytöllä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa PRP:n näytteiden bakteeriviljelmissä, eli pelkällä pölyttömällä, puhtaalla huoneella ja huolellisella valmistustekniikalla on mahdollista valmistaa steriiliä PRP:tä käsin.

Taulukko 2 Käsin suoritettavien valmistusmenetelmien sentrifugointikerrat ja PRP:n verisolujen rikastuminen (laskettu kaavalla (PRP:n solupitoisuus)/(kokoveren solupitoisuus)), listattu tutkimuksen julkaisuvuoden mukaan. Kierroslukumääränä minuutissa eli RPM-muodossa (revolution per minute) ilmoitetut sentrifugointinopeudet ovat vertailukelpoisia vain kyseisessä tutkimuksessa käytetyn sentrifugin roottorin kanssa. X = ei ilmoitettu, ACD-A = sitraatti-A-dekstroosihappo, ACD-B = sitraatti-B-dekstroosihappo, BC = buffy coat eli valkosolukerros, CPD = sitraatti-fosfaatti-dekstroosi, SC = natriumsitraatti, PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

Antikoa-gulantti / putki	1. sentrifugointi (erottelu)	2. sentrifugointi (rikastus)	Kohde-laji	Veri-hiuta-leet	Valko-solut	Puna-solut	Tutkimus
SC 5 ml putki	259 G; 6 min (plasmasta 50 % BC:n yläpuolelta)	-	Kani	1,2	0,5	0,02	González ym. 2016
CPD	270 G; 7 min (plasma BC:n yläpuolelta)	1000 G; 5 min	Hevonen	2,7	0,05	X	Tyrneno-poulou ym. 2016
SC putki	120 G; 5 min (plasmasta 50 % BC:n yläpuolelta)	240 G; 5 min (pohjan ¼)	Hevonen	2,7 2,9	1,1 1,2	X	Giraldo ym. 2015
ACD-A putki				2,9	1,3		
ACD-B putki							
ACD-A 10 ml	300G; 10min (yläosa + BC)	300G; 10 min (supernatant-ti)	Hevonen	2,1	2,3	X	Hessel ym. 2015
SC	2400 rpm; 10 min (plasma + BC)	3600 rpm; 15 min (pohjan 1/3)	Koira	4,2	3,4	X	Kazemi ym. 2015
ACD-A 30 ml	900 G; 5 min (alaosan plasma)	1500 g; 15 min (pohjan plasma)	Ihminen	7,8	0,4	0,02	Oh ym. 2015
	900 G; 5 min (yläosan plasma)	-		2,1	0,1	0	
SC	1000 rpm; 4 min (plasma + BC)	800 rpm; 9 min (kirkas plasma pois)	Ihminen	1,6	X	X	Sabarish ym. 2015
	2400 rpm; 10 min (plasma + BC)	3600 rpm; 15 min (kirkas plasma pois)		1,2	X	X	
ACD-A 8,5 ml putki	120 G; 5 min (plasmasta 50 % BC:n yläpuolelta)	240 G; 5 min (pohjan ¼)	Hevonen	1,8	0,5	0,02	Giraldo ym. 2013
ACD-A	1500 rpm; 5 min (yläosan plasma)	6300 rpm; 20 min (pohjan ½)	Ihminen	3,1	0,3	0,005	Mazzocca ym. 2012
ACD-A	300 G; 10 min (plasma, BC, 1 mm punasoluja)	5000 G; 5 min (kirkas plasma pois)	Kani	6,2	2,9	2,3 (hemato-kriitti)	Andrade ym. 2008

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Potilaiden valinta, niistä kerättävät tiedot ja tarvittava potilasmäärä

Tutkimusaineisto kerättiin Forssan Pilvenmäellä sijaitsevalta Elwet-klinikalta keväällä 2016 (maaliskuusta kesäkuuhun). Omistajalta, jonka hevonen tuli saamaan PRP-hoitoa, pyydettiin lupaa käyttää nimettömästi hevosen yksilöllisiä tietoja. PRP-hoidettaville hevosille tehtiin kliininen yleistutkimus, jolla poissuljettiin esim. akuutti tulehdus tai anemia. Hevosten tai omistajien nimitietoja ei kirjattu, vaan hevoset identifioitiin juoksevalla numerolla. Hevosista kirjattiin ylös hevostyyppi, sukupuoli ja ikä sekä näytteenoton päivämäärä. Hevostyyppit jaettiin kylmäverisiin (kv) ja lämminverisiin (lv). Suomenhevoset ja muut vankkarakenteiset tyypitettiin kylmäverisiin ja sirorakenteiset lämminverisiin. Jokaisesta hevosesta otettiin näyte kokoverestä ja valmistetusta PRP:stä.

Otoskoko on laskettu ensisijaisesti kahden hevostyyppin välillä olevan eron havaitsemiseksi käyttäen EpiTools-laskuria ”Sample size to estimate a single mean with specified precision” (Sergeant 2015). Siihen tarvittavat verihiutalearvojen keskihajonnat arvioitiin kahdessa eri tutkimuslaboratoriossa tutkittujen verinäytteiden verihiutalearvojen avulla karkeasti neljäsosaksi maksimi- ja minimiarvojen erotuksesta (Taylor 2015; taulukko 3). Otoskooksi saatiin näin $n = 68$ (95 %:n luottamustasolla ja hyväksyen $\pm 25 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ muutokset).

Taulukko 3 Verenkuvan viitearvot hevostyyppin mukaan kahden laboratorion antamien viitearvojen perusteella. LV = lämminverinen, KV = kylmäverinen, SD = standard deviation, keskihajonta

Verisolu- pitoisuuksien viitearvot ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$) eri hevos- tyyppien välillä	Movet 2015		Vetlab 2012		Viitearvojen keskiarvo laskettuna Movetin ja Vetlabin arvojen perusteella		Keskihajonta SD (max - min)/4 (Taylor 2015)	
	LV	KV	LV	KV	LV	KV	LV	KV
Valkosolut	6,0– 10,5	4,6– 9,5	6,4– 10,8	4,8– 9,3	6,2–10,7	4,7–9,4	1,1	1,2
Verihiutaleet	80– 500	80– 500	80– 500	80– 500	80–500	80–500	105	105

3.2 Valmistusmenetelmän kuvaus

Osa hevospotilaista rauhoitettiin ennen veren keruuta. Kaulalaskimon alue desinfioitiin ja verta otettiin 18 G 1,5'' vakuumineulalla (Vacuette®, Greiner Bio-One) 9 ml:n natriumsitraattivakuumiputkiin (sitraatti-A-dekstroosihappo, ACD 3,2 %, Vacuette®, Greiner Bio-One). Kerätty veritilavuus ja käytettyjen putkien määrä riippui siitä, paljonko potilaalle haluttiin valmistaa PRP:tä. Perusannoksena otettiin 13 putkea, joista yksi käytettiin kokoveren tutkimiseen ja 12 veriputkea sentrifugoitiin välittömästi 500 G:n voimalla 6,5 min ajan (Sigma 2-6E, roottori 11030, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Saksa). Ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen veri jakautui kolmeen osaan: pohjan punasolukerrokseen, valkosolukerrokseen sekä sen päällä olevaan plasmaan, jonka alaosa on verihiutalerikasta. Putkista otettiin pasteur-pipetillä valkosolukerroksen yläpuolelta varovasti puolet plasman alaosa erotusputkiin, jotka sentrifugoitiin 800 G:n voimalla 5 min ajan. Näistä putkista poistettiin ylimmäinen kolmannes plasmasta, joka sisältäisi vain vähän verihiutaleita. Pohjalle muodostunut sakka sekoitettiin jäljelle jääneeseen plasmaan imemällä pasteur-pipetillä varovasti edestakaisin, ja näin saatu P-PRP siirrettiin jokaisesta erotusputkesta yhteen astiaan. 118 ml:n kokonaisveritilavuudesta saatiin tällä tavalla n. 20 ml P-PRP:tä. Ennen annosten keruuta ruiskuihin lisättiin aktivaattorina kalsiumkloridia (CaCl₂, Baxter Calciumchlorid 5,5 %: Ca 0,5 mmol/ml; Ca 20 mg/ml) 1/10 PRP:n kokonaistilavuudesta, eli tässä tapauksessa 2 ml.

3.3 Näytteiden tutkiminen

Valmistuneesta P-PRP:stä otettiin yksi n. 1 ml:n näyte ennen aktivaattorin lisäystä puhtaaseen erotteluputkeen, joka lähetettiin yhdessä kokoverinäytteen kanssa Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan (ELTDK) keskuslaboratorioon analysoitavaksi hematologian automaattilaitteella (Advia 2120i, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Lähetys tapahtui Postin 1. luokan keltamustalla kirjeellä, ja analysointi suoritettiin noin vuorokauden kuluttua näytteenotosta. Pitkän säilytyksen takia verihiutaleet olivat turvonneet ja antoivat analyysissä vaihtelevia jättiverihiutalearvoja. Tämä huomioitiin verihiutalearvojen laskennassa lisäämällä jättiverihiutalearvot varsinaiseen verihiutalelukumäärään.

3.4 Tulosten tilastollinen analysointi

Tulokset analysoitiin SPSS®-ohjelmistolla (IBM®, SPSS® Statistics, versio 23.0). Tulosten normaalisuudet tutkittiin histogrammilla. Jos muuttujat eivät olleet jakautuneet

normaalisti, käytettiin ei-parametrisia testejä. Kahden jatkuvan muuttujan, kuten eri verisoluarvojen välisten korrelaatioiden tutkimisessa käytettiin Spearmanin testiä. Ei-monotonisen jatkuvan muuttujan, kuten iän korrelaatioissa verisoluarvoihin käytettiin Kendall Tau -testiä. Luokiteltujen muuttujien korrelaatioissa verisoluarvoihin käytettiin kahteen ryhmään jakautuneella hevostyyppiluokittelulla Kolmogorov-Smirnov -testiä ja kolmeen ryhmään jakautuvalla sukupuoliluokittelulla Kruskal Wallis -testiä. Kaikki tilastolliset testit tehtiin 95 %:n luottamustasolla. Jotta 95 %:n luottamustaso säilytettiin, jokaiselle yksittäisen testin raja-p-arvolle suoritettiin Bonferroni-korjaus tyyppi-1 -virheen, eli virheellisten positiivisten tulosten välttämiseksi. Kriittinen raja-p-arvo 0,05

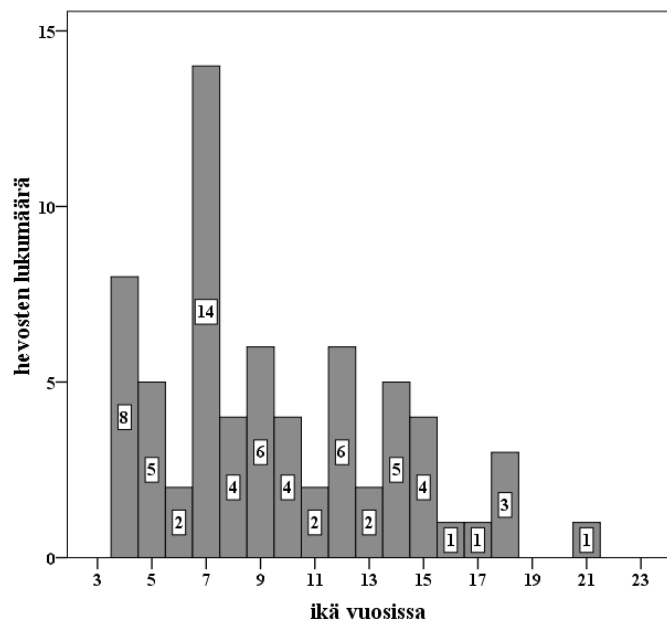
jaettiin suoritettujen korrelaatiotestien lukumäärällä, ja näin saatua uutta raja-p-arvoa käytettiin tilastollisesti merkitsevien tuloksien havaitsemiseksi (Statistics solutions 2016).

4 TULOKSET

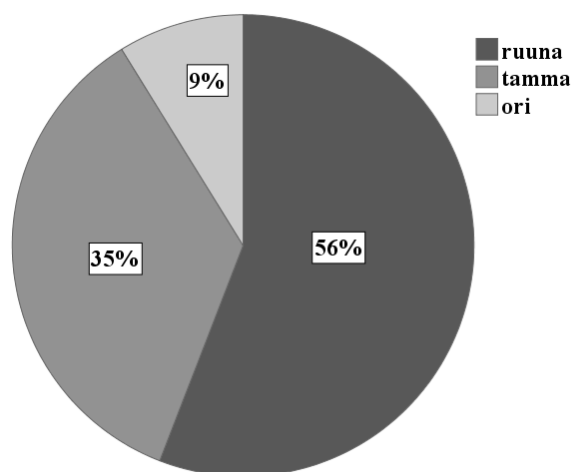
Tutkimukseen otettiin 68 hevosta, jotka tulivat klinikalla saamaan PRP-hoitoa. Potilaita ei valikoitu.

Potilaiden ikä vaihteli neljästä vuodesta 21 vuoteen (keskiarvo 10 vuotta), suurinta ikäryhmää edusti seitsemän vuotiaat (n = 14) (kuva 6). Hevosista 38 oli ruunia, 24 tammaa ja kuusi oria (kuva 7). Lämminverisiä oli 51, kylmäverisiä oli 15 (kuva 8) ja puoliverisiä kaksi. Puoliverisiä ei otettu hevostyyppinsä puolesta mukaan tarkasteluun pienen otannan takia.

Otannassa oli myös yksi russponi, joka hylättiin tarkastelusta, koska



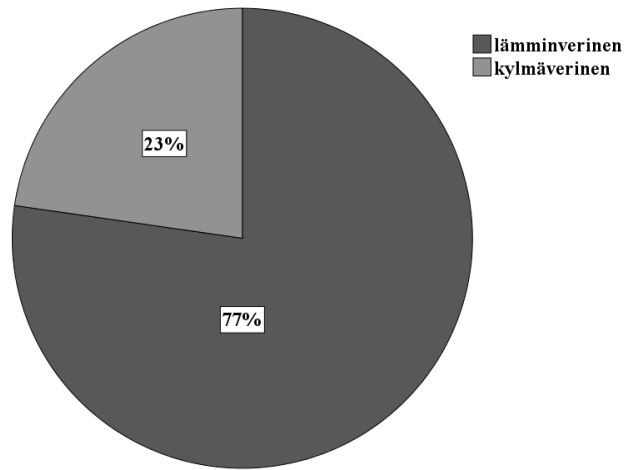
Kuva 6 Tutkimuksen hevospotilaiden ikäjakauma



Kuva 7 Tutkimuksen hevospotilaiden sukupuolijakauma

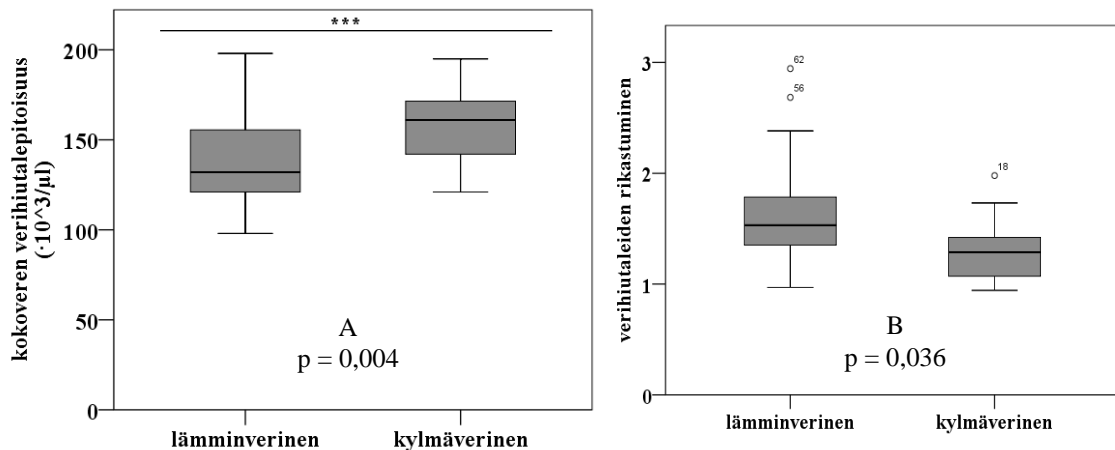
sen kokoveren hematologiset arvot poikkesivat niin paljon hevosista, sillä kokoveren verihiutalelukumäärä oli $230 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, kun hevospotilaiden keskiarvo oli $140 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ (taulukko 4).

Tutkimuksessa käytetyllä käsin suoritettulla valmistusmenetelmällä saatiin rikastettua verihiutaleita keskimäärin 1,5-kertaisesti (mediaani 1,4), ja vähennettyä valkosoluja 0,24-



Kuva 8 Tutkimuksen hevospotilaiden hevostyyppijakauma

ja punasoluja 0,012-kertaisesti kokovereen verrattuna (taulukko 4). Valkosoluista jäi eniten lymfosyyttejä, sitten monosyyttejä, eosinofiilejä, basofiilejä ja vähiten neutrofiilejä kokovereen verrattuna (taulukko 4). Yksilön ominaisuuksista sukupuoli tai ikä ei ollut assosioitunut kokoveren tai PRP:n verisolusisältöön. Ainoastaan hevostyyppi vaikutti kokoveren verihiutalelukuun, mikä nähtiin kylmäveristen kokoveren korkeampina verihiutalepitoisuuksina (kuva 9, taulukko 5). Bonferroni-korjauksen jälkeen raja-p-arvon ollessa 0,0056, hevostyyppi ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi PRP:n verihiutaleiden pitoisuuteen tai rikastumiseen, joka oli kuitenkin hieman korkeampi lämminverisillä ($p = 0,036$) (kuva 9, taulukko 5).



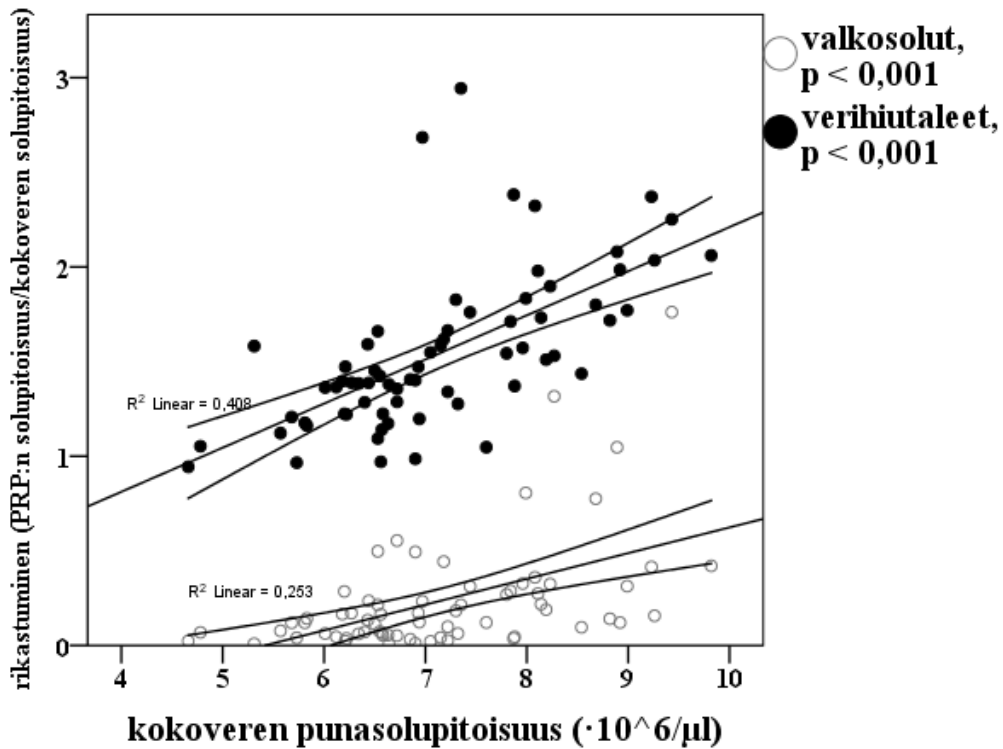
Kuva 9 Tutkimuksen hevospotilaiden kokoveren verihiutalepitoisuuden (A) ja PRP:n verihiutaleiden rikastumisen (B) tilastollisen merkitsevyyden erot hevostyyppin mukaan. Lämminveristen osuus $n = 51$, kylmäveristen osuus $n = 15$. Raja-p-arvo 0,0056. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

Taulukko 4 Tutkimuksen hevospotilaiden verisolupitoisuuksien keskiarvo, keskihajonta, mediaani sekä minimi- ja maksimipitoisuudet kokoveressä, PRP:ssä ja rikastumisessa. ka = keskiarvo, sd = keskihajonta (standard deviation), min = minimi, max = maksimi, PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

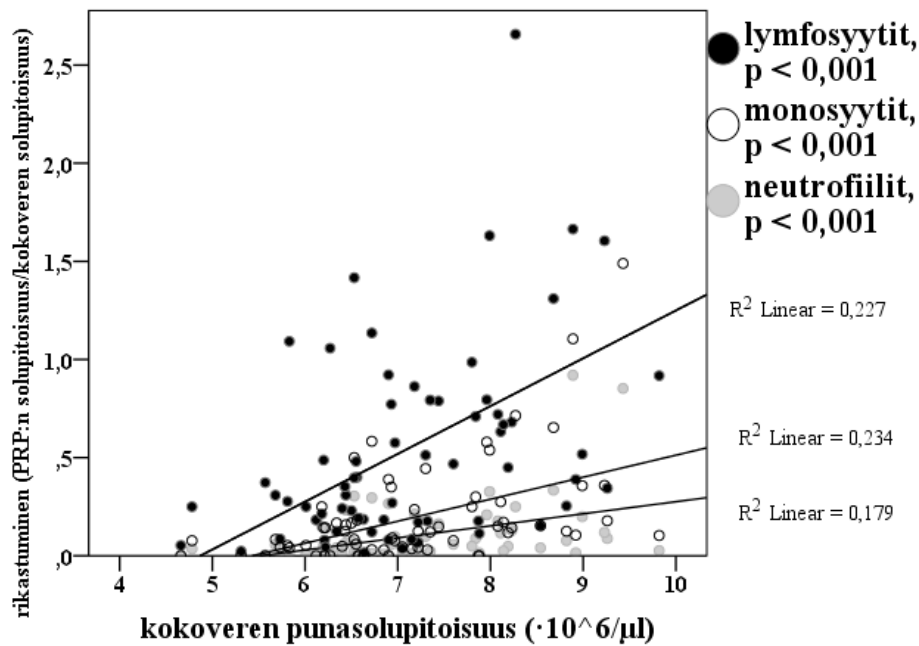
	kokoveri		PRP		rikastuminen (PRP/kokoveri)	
	ka ± sd	mediaani, min; max;	ka ± sd	mediaani, min; max	ka ± sd	mediaani, min; max
Verihiutaleet ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	140 ± 26	140, 98; 200	220 ± 76	210, 97; 520	1,5 ± 0,41	1,4, 0,9; 2,9
Valkosolut ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	6,1 ± 1,5	5,8, 3,1; 10	1,6 ± 2,5	0,75, 0,04; 15	0,24 ± 0,31	0,14, 0,01; 1,8
Punasolut ($\cdot 10^6/\mu\text{l}$)	7,2 ± 1,1	6,9, 4,7; 9,8	0,085 ± 0,083	0,06, 0,03; 0,54	0,012 ± 0,0086	0,0086, 0,00; 0,06
Neutrofiilit ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	4,1 ± 1,2	3,8, 2,3; 8,3	0,44 ± 0,93	0,14, 0,01; 6,4	0,1 ± 0,044	0,044, 0; 0,92
Lymfosyytit ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	1,7 ± 0,8	1,5, 0,6; 3,5	1,1 ± 1,7	0,47, 0,02; 10	0,55 ± 0,58	0,36, 0,02; 3
Monosyytit ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	0,25 ± 0,089	0,24, 0,06; 0,47	0,054 ± 0,1	0,02, 0; 0,70	0,19 ± 0,26	0,12, 0; 1,5
Eosinofiilit ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	0,089 ± 0,062	0,07, 0; 0,32	0,0072 ± 0,0067	0,01, 0; 0,02	0,11 ± 0,14	0,074, 0; 0,67
Basofiilit ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	0,014 ± 0,011	0,01, 0; 0,06	0,0022 ± 0,0064	0, 0; 0,04	0,12 ± 0,41	0, 0; 2,0

Taulukossa 6 on listattuna kokoveren verihiutale-, valkosolu- ja punasolupitoisuuksien korrelaatiot PRP:n verisolupitoisuuksiin ja niiden rikastumiseen. Kokoveren verihiutalepitoisuus vaikutti positiivisesti PRP:n verihiutalepitoisuuteen ($p < 0,001$), eli mitä enemmän kokoveressä oli verihiutaleita, sitä enemmän niitä oli myös PRP:ssä. Kokoveren verihiutalepitoisuus ei kuitenkaan vaikuttanut verihiutaleiden rikastumiseen. Verihiutaleiden ja valkosolujen rikastumiseen (kuva 10) sekä PRP:n verihiutale- ja valkosolupitoisuuteen vaikutti positiivisesti kokoveren punasoluluku ($p < 0,001$) (taulukko 6). Kun kokoveren punasolupitoisuus tai hematokriittiarvo oli korkeampi, myös PRP:n verihiutaleiden ja valkosolujen pitoisuus sekä rikastuminen olivat korkeampia (taulukko 7). 1,5-kertaisesti verihiutalerikastunutta ja 0,2-kertaisesti valkoseluköyhätyntä PRP:tä saatiin, kun kokoveren punasolupitoisuus oli 6,5–8,0 ($\cdot 10^6/\mu\text{l}$) välillä eli kun hematokriitti oli keskiarvoltaan 34 %. Lisäksi kokoveren punasoluluku vaikutti positiivisesti neutrofiilien, lymfosyyttien, monosyyttien (kuva 11) ja basofiilien pitoisuuteen PRP:ssä sekä niiden rikastumiseen ($p < 0,001$) basofiilejä

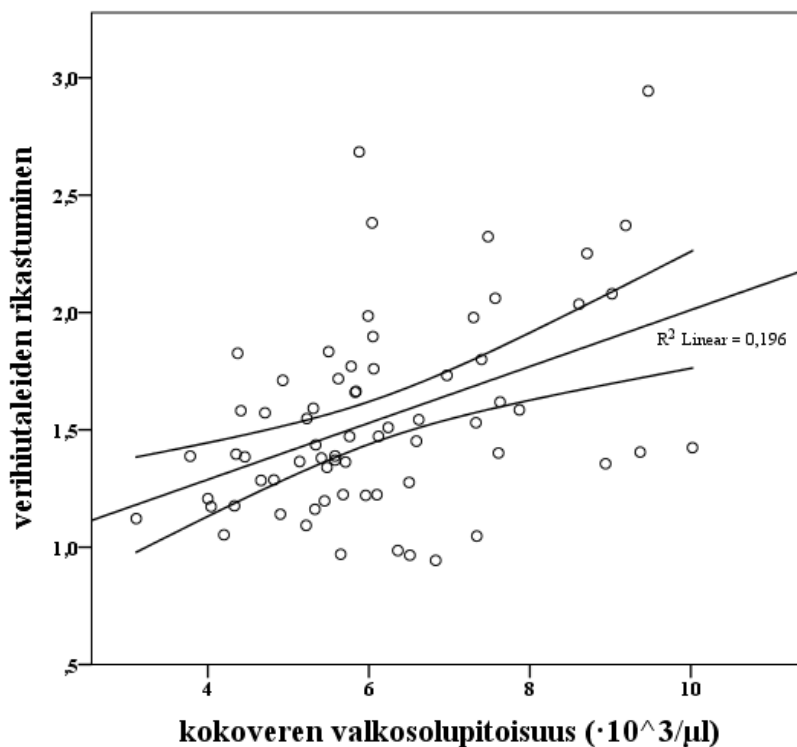
lukuunottamatta (taulukko 8). Kokoveren valkosolupitoisuus vaikutti positiivisesti PRP:n lymfosyytti-, monosyytti- ($p < 0,001$, $p = 0,002$) (taulukko 8) ja valkosolupitoisuuteen sekä verihiutaleen rikastumiseen ($p = 0,001$) (taulukko 6, kuva 12).



Kuva 10 Tutkimuksen hevospotilaiden kokoveren punasolupitoisuuden Spearmanin korrelaatio verihiutaleiden ja valkosolujen rikastumiseen PRP:ssä. Kuvaan merkattu lineaarinen trendiviiva, sen 95 %:n luottamusväli, korrelaatiokertoimet (R^2) ja korrelaatioiden p-arvot. Raja-p-arvo 0,0031. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).



Kuva 11 Tutkimuksen hevospotilaiden kokoveren punasolupitoisuuden Spearmanin korrelaatio lymfosyyttien, monosyyttien ja neutrofiilien rikastumiseen PRP:ssä. Kuvaan merkattu lineaarinen trendiviiva, korrelaatiokerroimet (R^2) ja korrelaatioiden p-arvot. Raja-p-arvo 0,0031. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).



Kuva 12 Tutkimuksen hevospotilaiden kokoveren valkosolupitoisuuden Spearmanin korrelaatio verihiutaleiden rikastumiseen (p = 0,001) PRP:ssä. Kuvaan merkattu lineaarinen trendiviiva, sen 95 %:n luottamusväli ja korrelaatiokerroin (R^2). Raja-p-arvo 0,0031. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

Taulukko 5 Tutkimuksen hevospotilaiden iän, hevostyyppin ja sukupuolen vaikutus PRP:n verisolupitoisuuksiin ja niiden rikastumiseen, tilastollisesti merkitsevät korostettu. Bonferroni-korjauksella uusi raja-p-arvo $< 0,0056$, kun $0,05/9 = 0,0056$. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

		verihiutaleet			valkosolut			punasolut		
Testi		kokoveren pitoisuus	PRP:n pitoisuus	rikastuminen	kokoveren pitoisuus	PRP:n pitoisuus	rikastuminen	kokoveren pitoisuus	PRP:n pitoisuus	rikastuminen
Kendall Tau	ikä	0,17	0,13	0,41	0,007	0,025	0,06	0,028	0,57	0,84
Kolmogorov- Smirnov	hevostyyppi	0,004	0,86	0,036	0,35	0,76	0,59	0,31	0,33	0,11
Kruskal Wallis	sukupuoli	0,77	0,90	0,97	0,53	0,65	0,71	0,50	0,92	0,91

Taulukko 6 Tutkimuksen hevospotilaiden kokoveren verisolupitoisuuksien vaikutus Spearmanin korrelaatiotestillä PRP:n verisolupitoisuuksiin ja niiden rikastumiseen, tilastollisesti merkitsevät korostettu. Bonferroni-korjauksella uusi raja-p-arvo $< 0,0031$, kun $0,05/16 = 0,0031$. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

PRP:n						
Kokoveren	Verihiutaleiden		Valkosolujen		Punasolujen	
	pitoisuus	rikastuminen	pitoisuus	rikastuminen	pitoisuus	rikastuminen
verihiutalepitoisuus	$< 0,001$	0,70	0,12	0,16	0,042	0,069
valkosolupitoisuus	0,004	0,001	0,001	0,073	0,84	0,33
punasolupitoisuus	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	0,002	0,48

Taulukko 7 Tutkimuksen hevospotilaiden kokoveren kolmen eri punasolupitoisuusluokan erot kokoveren hematokriitissa ja PRP:n verihiutale- ja valkosolupitoisuuden sekä niiden rikastumisen keskiarvoissa (rikastuminen laskettu kaavalla (PRP:n solupitoisuus)/(kokoveren solupitoisuus)). PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

Otoskoko (n)	Kokoveren punasolupitoisuus ($\cdot 10^6/\mu\text{l}$)	Kokoveren hematokriitti (keskiarvo; minimi – maksimi) (%)	PRP:n verihiutalepitoisuus ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	Verihiutaleiden rikastuminen	PRP:n valkosolupitoisuus ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	Valkosolujen rikastuminen
20	< 6,5	29; 22 – 32	180	1,3	0,49	0,099
32	6,5 – 8,0	34; 29 – 39	220	1,5	1,1	0,19
16	> 8,0	41; 34 – 45	280	1,9	3,9	0,50

Taulukko 8 Tutkimuksen hevospotilaiden kokoveren verisolupitoisuuksien vaikutus Spearmanin korrelaatiotestillä PRP:n eri valkosolutyypin pitoisuuksiin ja niiden rikastumiseen, tilastollisesti merkitsevät korostettu. Bonferroni-korjauksella uusi raja-p-arvo < 0,0031, kun $0,05/16 = 0,0031$. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma)

	PRP:n									
	neutrofiilit		lymfosyytit		monosyytit		eosinofiilit		basofiilit	
	pitoisuus	rikastuminen	pitoisuus	rikastuminen	pitoisuus	rikastuminen	pitoisuus	rikastuminen	pitoisuus	rikastuminen
Kokoveren										
verihiutale-pitoisuus	0,20	0,19	0,13	0,46	0,077	0,14	0,28	0,97	0,31	0,19
valkosolu-pitoisuus	0,047	0,36	< 0,001	0,03	0,002	0,14	0,36	0,65	0,007	0,11
punasolu-pitoisuus	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,49	0,98	< 0,001	0,011

5 POHDINTA

Tutkimuksessa käytetyllä käsin suoritettulla valmistusmenetelmällä saatiin 1,5-kertaisesti verihiutalerikastunutta PRP:tä, jossa oli hyvin vähän valkosoluja ja lähes olematon määrä punasoluja. PRP:n verisolupitoisuuksiin vaikutti eniten kokoveren punasolupitoisuus. Mitä enemmän kokoveressä oli punasoluja, sitä enemmän tällä valmistusmenetelmällä saatiin rikastettua verihiutaleita, mutta samalla rikastui myös valkosoluja. Verihiutaleita oli PRP:ssä 1,5-kertaisesti, kun potilaan kokoveren punasolupitoisuus oli 6,5–8,0 ($\cdot 10^6/\mu\text{l}$) välillä. Valkosoluista eniten väheni neutrofiilejä, jotka kirjallisuuden mukaan ovat kaikista haitallisimpia vammojen parantumisessa (DeLong ym. 2012). Vähiten valkosoluista väheni lymfosyyttejä ja monosyyttejä. Enimmillään lymfosyyttejä rikastui 3-kertaisesti ja monosyyttejä 1,5-kertaisesti kokovereen verrattuna. Monosyytit ovat verihiutaleiden lisäksi merkittävässä osassa kudosten paranemisessa ja ilman niitä kudonsvaurion paranemisen arvellaan olevan mahdotonta (kirjassa Fossum ym. 2013). Tulevaisuudessa olisikin hyvä selvittää, kannattaisiko monosyyttejä rikastaa verihiutalerikastettuun plasmaan ja mikä olisi yksinkertainen keino erottaa ne muista valkosoluista.

Tutkimuksemme osoittaa, että valmistettaessa tällä menetelmällä PRP:tä, yksilön kokoveren punasolupitoisuus tulee ottaa huomioon. Käyttämällämme menetelmällä saavutettiin korkeimmat verihiutalepitoisuudet niillä potilailla, joiden kokoveren punasolupitoisuus oli korkea. Tällöin kuitenkin verihiutaleiden lisäksi valkosoluista etenkin lymfosyytit ja monosyytit rikastuivat, eikä neutrofiilejä saatu vähennettyä kokovereen verrattuna selvästi. Tämä johtunee riittämättömästä sentrifugoinnista, sillä mitä punasolupitoisempaa verta, sen kovemman käsittelyn veri tarvitsee, jotta sen eri verisolut saadaan riittävän selkeästi erotettua toisistaan. Käytännössä PRP:tä valmistettaessa tämä havaittiin heikosti rajautuneena valkosolukerroksena ja joissain tapauksissa punasolujakin oli edelleen plasmassa. Toisaalta kokoveren hematokriittia ei mitattu ennen PRP:n suoritusta, joten silmämääräisesti huomattuihin eroihin ei voida täysin luottaa. Niiden potilaiden kokoveret, joiden punasolupitoisuudet olivat matalia, tuntuivat saavan menetelmässämme taas liian kovan käsittelyn; sentrifugoinnissa punasolujen lisäksi valkosolut ja oletetusti myös verihiutaleet laskeutuivat tiukasti omiin kerroksiinsa punasolupylvään päälle muodostaen selkeästi rajautuneen valkosolukerroksen. Pipetoitaessa valkosolukerroksen yläpuolelta ei siis saatu yhtä paljon

verihiutaleita, mikä näkyi matalana PRP:n rikastumisena. Andrade ym. (2008) totesivat kaneilla kokoveren hematokriitin olevan yhteydessä PRP:n verihiutaleiden rikastumiseen. Myös Robiony ym. (2002) osoittivat ihmisillä suoritetuissa tutkimuksissa matalamman sentrifugointivoiman olevan parempi rikastamaan verihiutaleita maksimaalisesti, jos potilaan hematokriitti oli alle 40 %. Vaadittaisiinkin jatkotutkimuksia siitä, tulisiko hevospotilaille suunnitella erilaisia sentrifugointiohjeita PRP:n valmistamiseen käsin kokoveren punasolupitoisuuden mukaan. Tällöin jokaiselta potilaalta tulisi selvittää perusverenkuva tai vähintään hematokriitti ennen PRP:n valmistusta. Tutkimuksemme pohjalta hematokriitin perusteella voidaan tehdä karkea ohjeistus erotussentrifugointivoimiin, jos tarkoituksena on saada n. 1,5-kertaista P-PRP:tä. Käyttämällä valmistusmenetelmällä tämä toteutui, kun hevospotilaiden hematokriitti oli keskimääräisesti 34 %. Sen perusteella erotussentrifugointeja voitaisiin säätää kevyemmiksi tai voimakkaammiksi. Esimerkiksi hematokriitin ollessa alle 30 %, erotussentrifugointi voitaisiin suorittaa 400 G:n voimalla ja yli 40 % n. 650 G:n voimalla. Jälkimmäisen rikastamissentrifugoinnin voiman muuttamisella ei ole yhtä paljon merkitystä kuin erotussentrifugoinnilla, koska sillä vain tiivistetään erotussentrifugoinnin jälkeen saatu PRP-fraktio putken pohjalle.

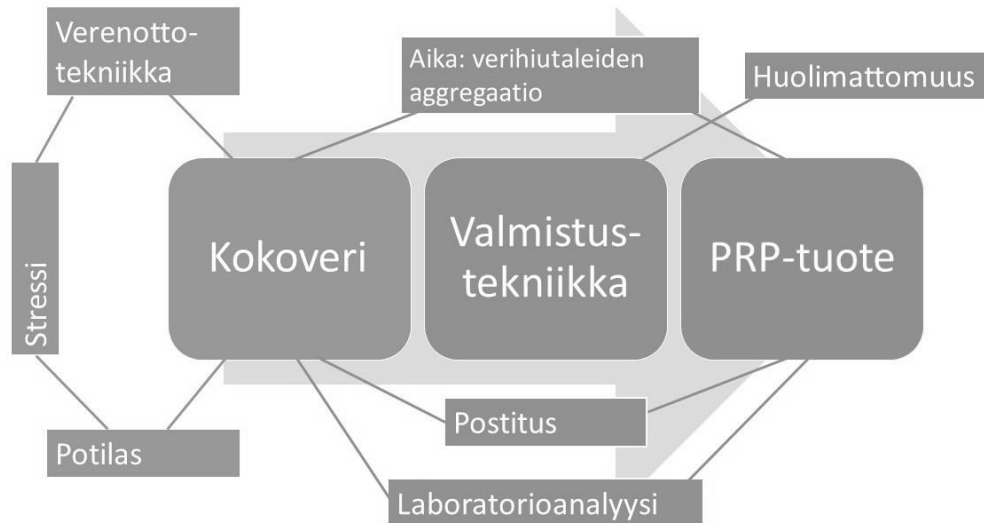
Aiemminkin on yritetty löytää ratkaisua PRP:n verihiutale- ja kasvutekijäpitoisuuksien rikastamiseen huomioimalla yksilön ominaisuudet, kuten rotu, ikä ja sukupuoli. Giraldon ym. (2013) mukaan sukupuoli vaikuttaa tilastollisesti merkitsevästi PRP:n verihiutalepitoisuuksiin. Heidän tutkimuksessa tammoilla oli korkeammat verihiutalepitoisuudet kokoveressä ja P-PRP:ssä, mitä ei todettu omassa tutkimuksessamme. Toisaalta heillä oli pienempi otanta ($n = 40$), joista tammoja oli vain 25 % ($n = 10$). Rodun epäiltiin vaikuttavan verihiutaleiden ja valkosolujen kokoon ja painoon, ja sen takia vaikuttavan PRP:n verisolujen erilaiseen saantoon. Tutkimuksessamme kylmäverisillä oli tilastollisesti merkitsevästi enemmän verihiutaleita kokoveressä, mutta lämminverisillä verihiutaleiden rikastuminen oli silti hieman korkeampi, mikä ei Bonferroni-korjauksen aiheuttaman raja-p-arvon laskun jälkeen ollut enää tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,036$). Hypoteesissa oletimme, että lämminveristen korkeammat kokoveren punasolupitoisuudet vaikuttaisivat verihiutaleiden rikastumiseen. Kokoveren punasoluarvot hevostyyppien välillä eivät kuitenkaan eronneet tilastollisesti merkitsevästi ($p = 0,314$). Hematokriitin viitearvot ovatkin lämminverisillä 32 – 53 % ja kylmäverisillä 24 – 44 % (kirjassa Smith 2015), eli

tämän perusteella hematokriittiarvoja 32 – 44 % esiintyy molemmilla. Lisäksi saman hevostyyppin sisällä yksilöiden hematokriittiarvot vaihtelevat suuresti kliinisen statuksen, käyttötarkoituksen, valmentautumisen, iän ja näytteenottotilanteen takia. Tällöin pelkän hevostyyppin perusteella ei tule muokata PRP:n valmistusta sentrifugoinnin osalta, vaan jokaiselta yksilöltä tulisi mitata hematokriitti.

Verisolupitoisuuksiin vaikuttavat yksilön ominaisuuksien lisäksi myös ulkopuoliset tekijät. Rinnovati ym. (2016) osoittivat ketoprofeinin vähentävän hevosilla verihiutaleiden liittymistä toisiinsa ja näin lisäämällä tilastollisesti merkitsevästi niiden määrää PRP:ssä. Ketoprofeinin aiheuttama hyytymättömyys johtuu vähentyneestä tromboksaanin TXA₂-tuotannosta ja nousseesta prostasyklinin PGI₂-tuotannosta. Nämä johtavat vähentyneen fibrinolyysin kautta verihiutaleiden yhteenliittymisen vähenemiseen (kirjassa Dugdale 2014). Omassa tutkimuksessamme omistajilta ei pyydetty hevospotilaiden lääkintäkirjanpitoa, joten tulehduskipulääkkeiden aiheuttamia mahdollisia vääristymiä tuloksissa ei ole voitu huomioida. Rinnovati ym. (2016) totesivat myös hevosen alentuneen nestetasapainon lisäävän PRP:n valkosolupitoisuutta. Tämän takia kuivunut hevonen tulisi nesteyttää ennen verenkeruuta, jos halutaan välttää PRP:n korkeaa valkosolupitoisuutta. Omassa tutkimuksessamme potilaat eivät olisi saaneet PRP-hoitoa, jos olisivat vaatineet kuivumisensa korjaamiseksi nesteytystä, eli tämä yksityiskohta oli huomioitu.

Tutkimuksemme suurin ongelma oli hematologisen analyysin tekeminen vuorokautta myöhemmin näytteenotosta ja PRP:n valmistuksesta. Taloudellisin vaihtoehto oli hyödyntää Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan (ELTDK) keskuslaboratoriota, jonne näytteet postitettiin Forssasta. Pitkä säilytysaika oli vaikuttanut hematologisiin tuloksiin nostamalla jättikokoisten verihiutaleiden määrää, mikä kertoi verihiutaleiden turpoamisesta. Nämä jättiverihiutaleiden lukuarvot lisättiin varsinaiseen verihiutalelukumäärään, ja tätä yhteenlaskettua lukuarvoa käytettiin laskelmissa. Vaikka näytteet olivat antikoagulanttikäsiteltyjä, verihiutaleita oli liittynyt yhteen, mikä nähtiin ”klimpeinä” näyteputkessa. Etenkin kudoskontaminaatio näytteenoton aikana voi aiheuttaa verihiutaleiden yhteenliittymistä. Tämä johtaa laskennallisesti alhaisempiin verihiutalepitoisuuksiin (kirjassa Thrall ym. 2004). Yleisesti ELTDK:n keskuslaboratoriossa välittömästi analysoitujen näytteiden verihiutalearvot ovat olleet 100 ± 10 ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$), satunnaisesti yli 200 ja erittäin harvoin 350. Niissäkin osa verihiutaleista on liittynyt yhteen muodostaen silminnähtäviä klimppejä (Satu Sankari,

henkilökohtainen tiedonanto). Näytteiden vanhuus tai tuoreus ei siis täysin selitä yhteen liittyneiden verihiutaleiden määrää. Todennäköisesti näytteiden käsittely, kuten veriputkien huolellinen kääntely antikoagulantin sekoittumiseksi on tärkeämpää.



Kuva 13 Tutkimuksen mahdollisten virhelähteiden kausaalikaavio. PRP = verihiutalerikastettu plasma (platelet rich plasma).

Kausaalikaaviossa (kuva 13) on esitetty mahdolliset virhelähteet, mitkä ovat voineet vaikuttaa syntyneen PRP:n verisolupitoisuuksiin. Yhtenä olennaisena virhelähteenä on verenottajan ja PRP:n valmistajan huolellisuus, eli henkilökunnan toiminnalla vaikutettiin niin kokoverestä kuin PRP:stä saataviin tuloksiin. Lisäksi ajan kulumisen näytteiden ostopäivästä analysointiin on vaikuttanut verisolujen turpoamiseen ja hajoamiseen sekä kokoveressä että PRP:ssä. Myös hevospotilaan mentaalinen tila ja mahdollinen stressi voi vaikuttaa kokovereen, jos sympaattisen hermoston vaikutuksesta pernasta on vapautettu punasoluja verenkiertoon. Taustalla voi olla niin kutsuttu valkotakkipelko tai kuljetuksen aiheuttama stressi ja rasitus. Kokoveri taas itsessään vaikuttaa aina suoraan valmistuvaan verihiutalerikastettuun plasmaan, joten kaikki siihen liittyvät virhelähteet näkyvät lopulta myös PRP:ssä.

Tulosten tilastotieteellisessä analysoinnissa huomioitiin Bonferroni-korjaus, jolla pyrittiin pienentämään tyyppi-1-virhettä eli vääriä positiivisia, mikä voisi seurata useiden korrelaatiotestien suorittamisesta. Tällöin 95 %:n luottamustason saavuttamiseksi tilastollisesti merkitseväksi hyväksyttävä raja-p-arvo oli aina sitä pienempi, mitä useampi korrelaatiotesti tekijälle oli suoritettu. Konservatiivisena korjauksena Bonferroni on

kuitenkin voinut vaikuttaa tyyppi-2-virheen eli väärän negatiivisen lisääntymiseen, jolloin tilastollisesti mahdollisesti merkitsevätkin tulokset jäivät huomaamatta, etenkin kun käyttämämme otoskoko oli suhteellisen pieni (kirjassa Dohoo ym. 2010). Otoskoko laskettaessa hyödynnetyt kahden eri laboratorion verihiutalepitoisuuksien viitearvot olivat lisäksi praktiikassa saataviin verihiutalearvoihin aivan liian laajat; käytännössä koskaan ei nähdä $500 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ulottuvia verihiutalepitoisuuksia (Satu Sankari, henkilökohtainen tiedonanto). Otoskoko laskettaessa ei ollut vielä tiedossa, missä laboratoriossa hematologiset analyysit tullaan suorittamaan. Hematologian automaattilaitteen Advia 2120i:n hevosten verihiutalepitoisuuksien viitearvojen 94–230 ($\cdot 10^3/\mu\text{l}$) (Cornell University, 2014) hyödyntäminen olisi pienemmän keskihajonnan takia muuttanut tarvittavaksi otoskooksi $n = 59$. Tämän perusteella siis pienempikin otoskoko olisi riittänyt, joten tämän tutkimuksen otoskoko ($n = 68$) voidaan pitää riittävänä.

Tutkimuksessa ei selvitetty kokoveren tai PRP:n kasvutekijäpitoisuuksia. Tämä olisi vaatinut erityiset järjestelyt näytteiden lähettämisessä, säilytyksessä ja analysoinnissa. Tutkimuksella ei siis voida ottaa täysin kantaa siihen, minkälaista PRP:tä tällä menetelmällä saatiin, koska kasvutekijäpitoisuudet eivät ole suoraan verrannollisia esimerkiksi verihiutalepitoisuuden kanssa. Oh ym. (2015) osoittivat, että ihmisillä PRP:n verihiutalepitoisuus ei vaikuttanut TGF- tai FGF-kasvutekijöiden pitoisuuksiin, mutta oli kuitenkin verrannollinen PDGF- ja VEGF-kasvutekijöiden kanssa. PRP:n kasvutekijäpitoisuuksiin vaikuttaa olennaisesti potilaan sen hetkinen veren sytokiinipitoisuus. Giraldo ym. (2013) totesivat hevosten TGF:n assosioivan PRP:n verihiutale- ja valkosolupitoisuuksien kanssa. Kasvutekijöiden pitoisuudet ovatkin huomattavasti yksilökohtaisemmat, kuin varsinaiset verisolupitoisuudet. Esimerkiksi anabolisten kasvutekijöiden, kuten IGF:n pitoisuus on todettu olevan huomattavasti korkeampi nuoremmilla, kuin vanhemmilla hevosilla (Nixon ym. 1999).

Tutkimukseemme ei sisällytetty kliinistä osuutta, jossa PRP-hoidon vastetta olisi seurattu. Potilasmateriaali ja niiden hoidetut vammat olivat hyvin vaihtelevia, eikä paranemisen seuranta eri ympäristössä pidetyiltä hevosilta olisi ollut mahdollista toteuttaa täysin luotettavasti.

Tutkimuksemme hypoteesi hevostyyppin, tässä tapauksessa kylmä- tai lämminverisyyden vaikutuksesta valmistuvan PRP:n solupitoisuuksiin ei toteutunut. Kylmäverisillä oli kokoveressä tilastollisesti merkitsevästi korkeammat verihiutalepitoisuudet, mutta

lämminveristen verihutaleiden rikastuminen oli keskimääräisesti, mutta ei merkitsevästi korkeampi. Tähän vaikutti eniten yksilön kokoveren punasolupitoisuus eli hematokriitti. Kokoveren punasolupitoisuudet eivät kuitenkaan poikenneet hevostyyppien välillä toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Saman hevostyyppin sisällä yksilöiden hematokriittiarvot voivat vaihdella suuresti kliinisen statuksen, käyttötarkoituksen, valmentautumisen, iän ja näytteenottotilanteen takia. Tämän takia jokaiselta potilaalta tulisi määrittää hematokriitti ennen käsin suoritettavan PRP:n valmistusmenetelmän valitsemista.

6 KIITOKSET

Haluan kiittää kaikkia ohjaajiani kärsivällisyydestä ja avusta lisenssiaatin tutkielmani valmistumisessa. Erityiskiitos Elwet Oy:n klinikkahoitaja Virpi Vuorelle, joka vastasi tutkimuspotilaiden tietojen kirjaamisesta sekä ELTDK:n keskuslaboratorion työntekijöille näytteiden analysoinnista.

7 LÄHDELUETTELO

- Álvarez M, Giraldo C, Carmona J. Monitoring bacterial contamination in equine platelet concentrates obtained by the tube method in a clean laboratory environment under three different technical conditions. *Equine Vet J* 2010, 42: 63-67.
- Andrade M, de Freitas Brandao C, Sá C, de Bittencourt T, Sadigursky M. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med O* 2008, 105: 5-12.
- Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PloS One* 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0121713.
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009, 23: 177-189.
- Bosch G, van Schie H, de Groot M, Cadby J, van de Lest C, Barneveld A, Weeren P. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J Orthop* 2010, 28: 211-217.
- Boswell S, Cole B, Sundman E, Karas V, Fortier L. Platelet-rich plasma: A milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 2012, 28: 429-439.
- Boswell S, Schnabel L, Mohammed H, Sundman E, Minas T, Fortier L. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sport Med* 2014, 42: 42-49.
- Brossi P, Moreira J, Machado T, Baccarin R. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *Bmc Vet Res* 2015, 11: 98-116.
- Cavallo C, Filardo G, Mariani E, Kon E, Marcacci M, Ruiz M, Facchini A, Grigolo B. Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing. *J Bone Joint Surg* 2014, 96: 423-429.
- Cornell University, College of veterinary medicine. Hematology reference intervals for Advia 2120. 2014. <https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/reference/hema.cfm> Haettu 1.2.2017.
- Davis V, Abukabda A, Radio N, Witt-Enderby P, Clafshenkel W, Cairone J, Rutkowski J. Platelet-rich preparations to improve healing. Part II: Platelet activation and enrichment, leukocyte inclusion, and other selection criteria. *J Oral Implant* 2014, 40: 511-521.
- DeLong J, Russel R, Mazzocca A. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy* 2012, 28: 998-1009.

- Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg* 2014, 7: 189-197.
- Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Veterinary epidemiologic research. 2. p. VER Inc, Charlottetown 2010.
- Dragoo J, Braun H, Durham J, Ridley B, Odegaard J, Luong R, Arnoczky S. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sport Med* 2012, 40: 1274-1281.
- Dugdale A. Veterinary anaesthesia: principles to practice. 1. p. Wiley-Blackwell, Chichester 2010.
- Fontenot R, Sink C, Were S, Weinstein N, Dahlgren L. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse. *Canadian Vet J* 2012; 53: 1266-1272.
- Fossum T, Dewey C, Horn C, Johnson A, MacPhail C, Radlinsky M, Schulz K, Willard M. Small animal surgery. 4. p. Mosby Elsevier, St Louis 2013.
- Geburek F, Gaus M, van Schie H, Rohn K, Stadler P. Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies – a randomized prospective controlled clinical trial. *Bmc Vet Res* 2016, 12: 191-207.
- Giraldo C, Álvarez M, Carmona J. Effects of sodium citrate and acid citrate de trose solutions on counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *Bmc Vet Res* 2015, 11: 60-67.
- Giraldo C, López C, Álvarez M, Samudio I, Prades M, Carmona J. Effects of the breed, sex and age on ular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *Bmc Vet Res* 2013, 9: 29-39.
- González J, López C, Carmona J. Implications of anticoagulants and gender on counts and growth factor concentration in platelet-rich plasma and platelet-rich gel supernatants from rabbits. *Vet Comp Orthopaed* 2016, 29: 115-124.
- Harrison S, Vavken P, Murray M. Erythrocytes inhibit ligament fibroblast proliferation in a collagen scaffold. *J Orthop Res* 2011, 29: 1361-1366.
- Harvest Technologies. SmartPReP2. 2016.
<https://www.harvesttech.com/clinician/clinician-home/prp/advantages/quality>. Haettu 31.10.2016.
- Hessel L, Bosch G, van Weeren P, Ionita J. Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine Vet J* 2015, 47: 319-325.
- Kazemi D, Fakhrjou A. Leukocyte and platelet rich plasma (L-PRP) versus leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) for articular cartilage repair of the knee: A comparative evaluation in an animal model. *Iran Red Crescent Me* 2015, doi: 10.5812/ircmj.19594.

- Kisiday J, McIlwraith C, Rodkey W, Frisbie D, Steadman J. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. *Cartilage* 2012, 3: 245-254.
- Leitner G, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, Körmöczy G, Buchta C. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang* 2006, 91: 135-139.
- Mariani E, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini M, Kon E, Marcacci M, Matteo B, Filardo G. Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of platelet-rich plasma in vitro. *Bmc Microbiol* 2015, 15.
- Mazzocca A, McCarthy M, Chowaniec D, Cote M, Romeo A, Bradley J, Arciero R, Beitzel K. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J bone Joint surg Am* 2012, 94: 308-316.
- Movet: Viitearvot – Hevonen. <http://www.movet.fi/media/viitearvot/hevonen.pdf>. Haettu 7.10.2015.
- Nixon A, Brower-Toland B, Sandell L. Primary nucleotide structure of predominant and alternate splice forms of equine insulin-like growth factor I and their gene expression patterns in tissues. *Am J Vet Res* 1999, 60: 1234-1241.
- Oh J, Kim W, Park K, Roh Y. Comparison of the cellular composition and cytokine-release kinetics of various platelet-rich plasma preparations. *Am J Sport Med* 2015, 43: 3062-3070.
- Pall corporation. E-PET. <http://www.pall.com/main/animal-health/product.page?id=53474>. Haettu 31.10.2016.
- Pifer M, Maerz T, Baker K, Anderson K. Matrix metalloproteinase content and activity in low-platelet, low-leukocyte and high-platelet, high-leukocyte platelet rich plasma (PRP) and the biologic response to PRP by human ligament fibroblasts. *Am J Sport Med* 2014, 42: 1211-1218.
- Pulse veterinary technologies. ProTec ® PRP. 2013. http://www.pulsevet.com/wp-content/uploads/2016/05/ProTec-Overview-Packet_-2015.pdf. Haettu 31.10.2016.
- Ross M, Dyson S. Diagnosis and management of lameness in the horse. 2. p. Elsevier/Saunders, St. Louis 2011.
- Rindermann G, Cislakova M, Gisela A, Bianca C. Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses. *J Vet Sci* 2010, 11: 173-175.
- Rinnovati R, Romagnoli N, Gentilini F, Lambertini C, Spadari A. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Vet Scand* 2016, doi: 10.1186/s13028-016-0226-3.
- Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Maxillofac Surg* 2002, 60: 630-635.

Sabarish R, Lavli V, Rao S. A comparison of platelet count and enrichment percentages in the platelet rich plasma (PRP) obtaining following preparation by three different methods. *J Clin Diagn Res* 2015, 9: ZC10-ZC12.

Salamanna F, Veronesi F, Maglio M, Bella E, Sartori M, Fini M. New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: General overview on still open questions and outlook. *Bmc Res Int* 2015, 2015: 1-24.

Sergeant, ESG, 2015. Epitools epidemiological calculators. AusVet animal health services and australian biosecurity cooperative research centre for emerging infectious disease. <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=1> Mean Haettu 19.10.2015.

Sjaastad OV, Sand O, Hove K. Physiology of domestic animals. 2. p. Scandinavian veterinary press, Oslo 2010.

Smith B. Large animal internal medicine. 5. p. Mosby/Elsevier, St. Louis 2015.

Statistics Solutions. Bonferroni correction. <https://www.statisticssolutions.com/bonferroni-correction/> Haettu 1.2.2017.

Sundman E, Cole B, Fortier L. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the ular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sport Med* 2011, 39: 2135-2140.

Taylor Courtney, About.com Guide: Range rule for standard deviation; How to estimate the standard deviation. <http://statistics.about.com/od/Descriptive-Statistics/a/Range-Rule-For-Standard-Deviation.htm> Haettu 19.10.2015.

Textor J, Tablin F. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: Clinical signs and cytologic responses. *Vet Surg* 2013, 42: 499-510.

Thomopoulos S, Kim M, Das R, Silva M, Sakiyama-Elbert S, Amiel D, Gelberman R. The effects of exogenous basic fibroblast growth factor on intrasynovial flexor tendon healing in a canine model. *J Bone Joint Surg* 2010, 13: 2285-2293.

Thrall M, Baker D, Lassen E. Veterinary hematology and clinical chemistry. 1. p. Wiley-Blackwell, Iowa 2012.

Tyrnenopoulou P, Diakakis N, Karauannopoulou M, Savvas I, Koliakos G. Evaluation of intra-articular injection of autologous platelet lysate (PL) in horses with osteoarthritis of the distal interphalangeal joint. *Vet Quart* 2016, 36: 56-62.

Vetlab. Viitearvot, hevonen. 2012. http://www.vetlab.fi/SIRA_Files/downloads/PDF_DOKUMENTIT/viitearvot_hev_2012.pdf Haettu 7.10.2015.

Vet-Stem biopharma. Genesis CS-2 PRP. <http://www.vet-stem.com/pdfs/6510-0002-005%20PRP%20Detailer.pdf>. Haettu 31.10.2016.

Vet-Stem biopharma. V-Pet. <http://www.vet-stem.com/pdfs/6605-0017-001%20V-PET%20Introduction.pdf>. Haettu 31.10.2016.

Wang, H-L, Avila G. Platelet rich plasma: Myth or reality? *Eur J Dent* 2007, 1: 192-194.

Yoshida R, Cheng M, Murray M. Increasing platelet concentration in platelet-rich plasma inhibits anterior cruciate ligament function in three-dimensional culture. 2014. J Orthop Res 2014, 32: 291-295.

Yoshida R, Murray M. Peripheral blood mononuclear s enhance the anabolic effects of platelet-rich plasma on anterior cruciate ligament fibroblasts. J Orthop Res 2013, 31: 29-34.

Yuan T, Zhang C-Q, Wang J. Augmenting tendon and ligament repair with platelet-rich plasma (PRP). Muscles Ligaments Tendons J 2013, 3: 139-149.

Zimmer Biomet. GPS III. http://www.biomet.com/wps/wcm/connect/internet/495a2ac6-b2ed-48ec-930b-0cd0bb41ed0c/BBI0022.0_081508.pdf?MOD=AJPERES. Haettu 5.12.2016.